

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde u. Infektionskrankheiten.

Zweite Abteilung:

**Allgemeine, landwirtschaftlich-technologische
Bakteriologie, Gärungsphysiologie,
Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz.**

In Verbindung mit

Prof. Dr. Adametz in Wien, Prof. Dr. J. Behrens in Augustenberg,
Prof. Dr. M. W. Beijerinck in Delft, Dr. v. Freudenreich in Bern, Privatdocent
Dr. Lindau in Berlin, Prof. Dr. Lindner in Berlin, Prof. Dr. Müller-Thurgau
in Wädenswil, Prof. Dr. M. C. Potter, Durham College of Science, New-
castle-upon-Tyne, Dr. Erwin F. Smith in Washington, D.C., U.S.A., Prof.
Dr. Stutzer in Königsberg i. Pr., Prof. Dr. Wehmer in Hannover, Prof. Dr.
Weigmann in Kiel und Prof. Dr. Winogradsky in St. Petersburg

herausgegeben von

Dr. O. Uhlworm in Berlin W., Schaperstr. 2/3 I.

und

Prof. Dr. Emil Christian Hansen in Kopenhagen.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

IX. Bd.

Jena, den 1. Juli 1902.

No. 1/2.

Inseratenannahme durch Max Gelsdorf, Leipzig-Gohlis, Böhmestr. 9.

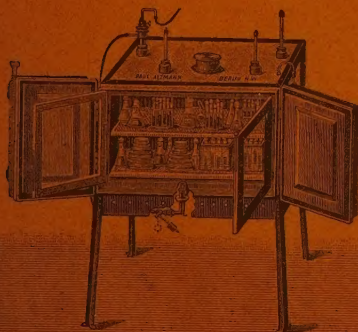
Buchhändleranzeigen an die Verlagshandlung erbeten.

Paul Altmann

Luisen-Strasse 47. Berlin N.W., Luisen-Strasse 47.

Fabrik und Lager

**aller Apparate und Utensilien für Chemie, Bacteriologie,
Microscopie und Hygiene.**



**Vollständige Einrichtungen
von
bakteriolog.-microscopischen Laboratorien,
sowie
hygienisch-chemischen Arbeitsstätten.
Präparaten-Cylinder
für
anatomische u. patholog. Sammlungen.**

Specialität: Brutschränke
in dauerhafter, zweckmässiger Ausführung
und jeder Grösse.

**Kleine vollständige Einrichtungen für
bacteriologische Untersuchungen von
250 Mark an.**

Ausführliche illustrierte Kataloge an Interessenten gratis und franco.



„Viberon“

Neuer transportabler, äusserst handlicher Apparat für Kohlensäurebetrieb
für Vibrations- etc. Massage

Ehrendiplom mit goldener Medaille
Hamburg-Altona September 1901

In- und Ausländische Patente

findet überall im In- und Auslande die grösste Anerkennung. Erprobt und glänzend begutachtet von den ersten med. Autoritäten, im Gebrauch in Berlin (Kgl. Charité, in der Massage-Anstalt der Kgl. Universität, in der Privatklinik des Herrn Geheimrat Prof. Eulenburg, sowie des Herrn Prof. Silex, in Kliniken und Privatanstalten etc.), ferner bisher in Breslau, München, Hannover, Frankfurt a. M., Liegnitz, Bremen, Braunschweig, Cöln, Dortmund, Potsdam, Rathenow, Stendal, Harburg, Salzwedel, Friedenau, London, Wien, Budapest, Zürich, Glarus etc.

Motor

für Kohlensäure-Betrieb im Anschluss an den Viberon für chirurgische, zahnärztliche, wissenschaftliche und technische Zwecke.



Telegramm-Adresse: Viberon-Berlin.



Zeitschrift für Vibrationstherapie und Prospekte auf Wunsch.

Dr. Ed. Kaiser's Institut, Berlin SW. 47.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Soeben erschienen:

Ehrlich's Seitenkettentheorie

und ihre Anwendung auf die künstlichen Immunisierungsprozesse.

Zusammenfassende Darstellung

von

Prof. Dr. Ludwig Aschoff, Göttingen.

Mit 1 Tafel und 16 Abbildungen im Text.

Preis: 4 Mark 50 Pf.

Alle Präparate für mikroskopische Zwecke

mikrochemische Reagentien, Farbstoffe, Farbstoffcombinationen, Härtings- und Einbettungsmittel, Untersuchungsflüssigkeiten, Einschlussmedien und Nährböden etc. liefert

E. Merck chem. Fabrik, Darmstadt

CENTRALBLATT

für

Bakteriologie, Parasitenkunde u. Infektionskrankheiten.

Zweite Abteilung:

**Allgemeine, landwirtschaftlich-technologische
Bakteriologie, Gärungsphysiologie,
Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz.**

In Verbindung mit

Prof. Dr. Adametz in Wien, Prof. Dr. J. Behrens in Augustenberg,
Prof. Dr. M. W. Beijerinck in Delft, Dr. v. Freudenreich in Bern, Privatdocent
Dr. Lindau in Berlin, Prof. Dr. Lindner in Berlin, Prof. Dr. Müller-Thurgau
in Wädenswil, Prof. Dr. M. C. Potter, Durham College of Science, New-
castle-upon-Tyne, Dr. Erwin F. Smith in Washington, D.C., U. S. A., Prof.
Dr. Stutzer in Königsberg i. Pr., Prof. Dr. Wehmer in Hannover, Prof. Dr.
Weigmann in Kiel und Prof. Dr. Winogradsky in St. Petersburg

herausgegeben von

Dr. O. Uhlworm in Berlin W., Schaperstr. 2/31.

und

Prof. Dr. Emil Christian Hansen in Kopenhagen.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

IX. Band.

Jena, den 1. Juli 1902.

No. 1/2.

Jährlich erscheinen zwei Bände zu 26 Nummern. Preis für den Band 15 Mark.
Preis für eine einfache Nummer 80 Pfg., für eine Doppelnummer 1 Mark 60 Pfg.
Nummern mit Tafeln kosten 60 Pfg. für jede Tafel mehr.

Hierzu als regelmäßige Beilage die Inhaltsübersichten der I. Abteilung des Centralblattes.

*Wünsche wegen Lieferung von besonderen Abdrücken wollen die
Herren Mitarbeiter auf die Manuskripte schreiben oder bei Rücksendung
der ersten Korrekturabzüge der Verlagsbuchhandlung mitteilen.*

Herrn Prof. Dr. Emil Chr. Hansen

zum 25jährigen Jubiläum

am 1. Juli 1902.

Am 1. Juli 1902 sind 25 Jahre verflossen, seitdem Herr
Professor Dr. Emil Chr. Hansen seine hochbedeutsamen
Forschungen auf dem Gebiete der Gärungsphysiologie in

dem Carlsberg-Laboratorium zu Kopenhagen begann, Untersuchungen, welche seinen Namen weit über die Grenzen seines Vaterlandes bekannt gemacht und einen hochbedeutenden Fortschritt in der Biologie der Gärungsorganismen und damit der Gärungsindustrie überhaupt bedeuten. Der Unterzeichnete, dem die Ehre zuteil geworden ist, den hochverdienten Jubilar zu den Mitherausgebern dieser Zeitschrift zählen zu dürfen und der in mehr wie 20jähriger redaktioneller Thätigkeit sehr viele Beweise der Freundschaft und des Interesses seitens des Herrn Professor Hansen erfahren hat, will die Gelegenheit nicht vorbeigehen lassen, zugleich mit im Namen der Verlagshandlung zum Jubiläumstage die herzlichsten Glückwünsche darzubringen. Möge es dem verdienstvollen Forscher, meinem treubewährten Freunde, noch viele Jahre vergönnt sein, in voller geistiger Frische weiter zu arbeiten an dem Ausbaue seines Lebenswerkes, welches seinem Namen auf alle Zeiten einen Ehrenplatz in der Wissenschaft gesichert hat.

Berlin, den 29. Juni 1902.

Dr. Oskar Uhlworm.

Original-Mitteilungen.*Nachdruck verboten.***Ueber die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien.**Von **M. W. Beijerinck** und **A. van Delden** in Delft.

Früher¹⁾ wurde gezeigt, daß in Nährlösungen, welche nur Spuren von Stickstoffverbindungen, jedoch die übrigen Nährstoffe in genügender Menge, und zwar den Kohlenstoff als Kohlehydrat enthalten, bei der Infektion mit Gartenerde, oder mit anderen fruchtbaren Bodenarten bei reichlichem Luftzutritt üppige Kulturen von einer charakteristischen Bakterie, *Azotobacter chroococcum*, entstehen, welche bald dadurch über alle anderen nebenbei wachsenden Arten derweise den Vorrang gewinnt, daß die gesamte neugebildete Bakterienmasse daraus vorwiegend, wenn auch nicht gänzlich, bestehen kann. Es stellte sich heraus, daß bei diesem Versuche eine reichliche Bindung von freiem atmosphärischen Stickstoff stattfinden kann.

Fortgesetzte Beobachtungen lehrten, daß *Chroococcum* in Reinkultur in jener stickstoffarmen Nährlösung nicht zu einer beträchtlichen Stickstoffassimilation Veranlassung giebt (Versuche 31 a, 31 b und 31 c), sondern daß dessen Wachstum und Vermehrung darin bald aufhört, trotzdem die Kohlenstoffquelle noch lange nicht erschöpft ist. Es mußte also die Vermehrung von *Chroococcum* in den Rohkulturen, welche mit dem vollständigen Verbrauch der Kohlenstoffnahrung und mit Stickstoffbindung einhergeht, auf der Symbiose mit anderen Mikroben beruhen.

Es stellte sich heraus, daß diese für *Chroococcum* notwendigen Symbionten Bakterien sind, welche zu zwei Gruppen gehören: Sporenbildner aus der Gattung *Granulobacter* und nicht sporenerzeugende Arten, wovon wir Ursache hatten, besonders zwei Formen ausführlicher zu untersuchen. Diese Formen sind einerseits der allbekannte *Aërobacter aërogenes* und zweitens eine sehr formenreiche, noch nicht beschriebene Art, welche weiterhin *Bacillus radiobacter* genannt werden wird.

Alle Arten der Gattung *Granulobacter*, sowohl die aëroben wie die anaëroben besitzen an und für sich schon das Vermögen, den freien Stickstoff zu binden, doch zeigen sie erst bei der Symbiose mit *Chroococcum* in dieser Beziehung ihre Fähigkeit in Vollendung.

Dagegen kann *Aërogenes* an und für sich den freien Stickstoff sicher nicht binden und ebensowenig gelang es, dieses Vermögen für die Reinkulturen von *Radiobacter* nachzuweisen.

Bei der Symbiose mit *Chroococcum* müssen also entweder *Aërogenes* und *Radiobacter* die Assimilationsfähigkeit erlangen, oder es ist *Chroococcum* selbst, welches dann dazu

1) Centralbl. f. Bakt. etc. 2. Abt. Bd. VII. 1901. p. 561.

befähigt wird, oder sowohl die letztere als die ersteren Arten erhalten dadurch zugleich diese Fähigkeit.

Wir haben lange gemeint, daß nur *Chroococcum* allein bei der Symbiose das stickstoffbindende Agens sein könnte. Doch sind wir gegenwärtig zu einer anderen Meinung gelangt und müssen annehmen, daß eben *Radiobacter* und *Aërogenes* dieses merkwürdige Vermögen bei der Symbiose erlangen. Für *Radiobacter*, welcher nahe mit *Radiciicola* verwandt ist, erscheint diese Ansicht naturgemäß, doch müssen wir anerkennen, daß die Sachen für *Aërogenes* anders liegen. Wir selbst haben dann auch lange gezögert, die Stickstoffassimilation durch *Aërogenes* für möglich zu halten, besonders weil es durchaus nicht bei jedem Versuche gelingt, sich von der Realität dieses Vorganges zu überzeugen, wodurch wir veranlaßt waren, bei denjenigen Versuchen mit *Aërogenes* und *Chroococcum*, wo Stickstoffbindung thatsächlich stattfand, nach zufälligen Infektionen durch *Granulobacter* zu suchen. Da wir diese jedoch bei der genauesten Untersuchung nicht finden konnten, muß auch *Aërogenes* einstweilen als Stickstoffsammler bei der Symbiose mit *Chroococcum* betrachtet werden.

Bei dem Studium der Kombinationen zwischen den *Granulobacter*-Arten und *Chroococcum* stellte sich die folgende merkwürdige Thatsache heraus: Es kann die Anzahl der *Granulobacter*-Stäbchen, welche in den Nährlösungen genügen, um ein sehr üppiges Wachstum von *Chroococcum* zu bewirken, eine so geringe sein, daß sie mikroskopisch zwischen den Tausenden von *Chroococcum*-Zellen schwierig zu finden sind. Einerseits erscheint es dadurch ausgeschlossen, daß die Bedeutung der Symbiose mit *Chroococcum* für die stickstoffbindenden Bakterien ausschließlich in einer Herabsetzung des Sauerstoffdruckes durch das intensive Wachstum des letzteren gelegen sein kann, obschon es feststeht, daß diese Herabsetzung für die Stickstoffbindung, wenigstens für *Granulobacter*, sicher günstig ist. Andererseits muß daraus die wichtige Folgerung abgeleitet werden, daß das erste Assimilationsprodukt des freien Stickstoffs eine Stickstoffverbindung ist, welche in der Flüssigkeit außerhalb der erzeugenden Bakterien im freien Zustande vorkommt, und deshalb für alle diejenigen Mikroben oder anderen Organismen erreichbar ist, welche damit ihr Stickstoffbedürfnis befriedigen können.

Diese Regel muß allgemeine Gültigkeit besitzen. Sie trifft sicher zu für das durch *Granulobacter* erzeugte Produkt, welches durch *Chroococcum* aufgenommen und das Wachstum verwendet wird. Sie muß aber auch zutreffen für die durch *Radiobacter* erzeugte Stickstoffverbindung, denn bei dessen Symbiose mit *Chroococcum* in stickstoffreicher Nährlösung findet zwar vorzugsweise Wachstum von *Radiobacter* selbst statt, jedoch wird darin auch ein so profuses Wachstum von *Chroococcum* beobachtet, daß es feststeht, daß auch diese Art darin eine Stickstoffverbindung disponibel findet. Es kann bei diesem Thatbestande kaum bezweifelt werden, daß die gleiche Regel für *Aërogenes* gelten wird.

Die Natur dieser aus dem freien atmosphärischen Stickstoff erzeugten Verbindung, worüber am Schlusse noch einige Betrachtungen vorkommen, konnte noch nicht festgestellt werden, doch ist mit dem Nachweis derselben die alte Theorie beseitigt, nach welcher das Bakterieneiweiß selbst das erste nachweisbare Assimilationsprodukt des Stickstoffs sein sollte, und die gegenwärtig herrschende Auffassung bezüglich der natürlichen Stickstoffanreicherung im Kulturboden muß dadurch ebenfalls eine Umwandlung erfahren.

Weil die Sporen, besonders von den aëroben *Granulobacter*-Arten, sehr resistent sind und selbst kräftiges Kochen gut überstehen, und weil schon eine mikroskopisch schwerlich nachweisbare Verunreinigung mit diesen Mikroben in den *Chroococcum*-Kulturen eine beträchtliche Stickstoffbindung veranlassen kann, müssen besonders die Kombinationskulturen mit den nicht-sporenerzeugenden Arten genau überwacht und die Nährlösungen sorgfältig sterilisiert werden. Dieser Umstand war es, welcher veranlaßte, daß wir so lange geglaubt haben, daß überall, wo wir in den *Chroococcum*-Kulturen Stickstoffbindung beobachteten, solche versteckte *Granulobacter*-Keime gegenwärtig waren, welche trotz unserer Kautelen entweder aus den infizierten Reinkulturen von *Chroococcum* oder bei der Infektion aus der Luft in die Nährlösungen hinein gelangt waren. Doch konnten wir nach längerer Beschäftigung, wie gesagt, an der Richtigkeit unserer beschriebenen Beobachtungen nicht mehr zweifeln.

Das Vermögen, den freien Stickstoff festzulegen, geht bei allen Arten der Gattung *Granulobacter* leicht verloren durch fortgesetzte Kultur an der Luft, wie sie z. B. von selbst bei der Reinkultur auf festem Substrate vorkommt. Der Nachweis dieses Umstandes erscheint uns wichtig und veranlaßte, in die Tabellen manche Bestimmungen aufzunehmen, welche wegen der geringen Stickstoffbindung anders kaum in Betracht gezogen sein würden. Da dieselben jedoch immer Bezug hatten auf Kulturen, welche uns im Anfange, das heißt bei erster Impfung, sehr erheblichen Stickstoffgewinn ergeben hatten, war deren Aufnahme nicht ohne Interesse.

Der Verlust jener Funktion geht genau parallel mit dem Vermögen der bezüglichen Formen, beim Wachsen mit wenig Sauerstoff auszukommen, also mit ihrer Mikroaërophilie, — das Wort Anaërobieose kann hier nicht verwendet werden, weil es sich um Arten handelt, welche sehr gut an der Luft gezüchtet werden können. — Die Mikroaërophilie geht aber ebenfalls verloren durch Kultur bei vollem Luftdrucke.

Für Versuche über die Stickstoffbindung, wobei *Granulobacter* in Verwendung kommt, sind diese Bemerkungen von Wichtigkeit: Wünscht man viel Stickstoff zu binden, so ist es ratsam, die frisch isolierten Reinkulturen zu verwenden. Hierzu wird die Nährlösung mit pasteurisierter Gartenerde und *Chroococcum* geimpft; nach 2 oder 3 Tagen hat man eine profuse Kultur von *Granulobacter* + *Chroococcum*. Es wird hieraus abgeimpft auf Glukoseagar und die dadurch erhaltenen,

gewöhnlich weit umherkriechenden aeroben *Granulobacter*-Kolonien werden ohne Verweilen für die Kombinationskultur verwendet. Wünscht man für Serienkulturen auf festem Substrate in Eprouvetten überzuimpfen, so geschieht dieses am besten mit *Chroococcum* zusammen, was wenigstens einigermaßen vor Degeneration schützt.

Auf die Variation von *Chroococcum* sowie auf diejenige der nicht-sporenbildenden Symbionten hat der Sauerstoffdruck einen ähnlichen Einfluß, jedoch liegen die Verhältnisse hier weniger deutlich und entziehen sich leicht der Beobachtung. Doch muß an dieser Stelle nachdrücklich hervorgehoben werden, daß *Chroococcum* eine sowohl in ernährungsphysiologischen, wie in anderen Beziehungen sehr veränderliche Bakterie ist, welche z. B. ihre bemerkenswerte Eigenschaft sich dunkelbraun färben zu können, innerhalb einer einzelnen Kolonie oft segmentweise verliert, so daß man schließlich eine Kolonie mit zahlreichen dunkeln und weißen Sektoren vor sich sieht. Diese Variationsverhältnisse erklären die unregelmäßigen, bei den Analysenrohkulturen gewonnenen Zahlen besser, wie das durch besondere Infektionen oder durch das Kulturverfahren hervorgerufene Artengemisch.

Wir können also kurz sagen, daß für die Stickstoffbindung ein bestimmter Accommodationszustand gegenwärtig sein muß, welcher Zustand sich vorfindet bei den bezüglichen Keimen, sowohl in der Erde selbst, wie in den durch das Plattenverfahren erhaltenen frischen Isolierungen, während derselbe in unseren, auf festem Substrate aerob geführten Kulturen mehr oder weniger schnell und mehr oder weniger vollkommen verloren geht. Bei der ununterbrochenen Ueberimpfung der Rohkulturen in den Nährlösungen kann aber die Konstanz erhalten bleiben.

Wie man sehen wird, schließt unsere Versuchsanstellung sich an diejenige von Winogradsky an¹⁾. Daß wir in mehreren Hinsichten zu anderen Ergebnissen gekommen sind wie dieser Forscher, liegt einerseits daran, daß wir die Anaërobie, welche die Grundlage seiner Versuche war, bei einem Teile der unserigen eingeschränkt oder beseitigt haben, andererseits an der Einführung von *Chroococcum*, wodurch wir eine erhebliche Verbesserung des Kulturverfahrens, auch bei den Versuchen mit Anaëroben erzielten, und dadurch in günstigen Fällen doppelt soviel freien Stickstoff binden konnten, wie die höchsten Erträge, welche er bei seinem Verfahren gefunden hat.

1. Bakteriologisches Verhalten der Rohkulturen von *Chroococcum*.

Für die Rohkulturen kam die früher beschriebene Nährlösung: Leitungswasser 100, Mannit (oder Glukose) 2, K^2HPO^4 0,05 wieder in Verwendung. Damit wurden große Kolben mit flachem Boden

1) Recherches sur l'assimilation de l'azote libre de l'atmosphère par les microbes. (Archives des sciences biologiques de St. Pétersbourg. T. III. 1895. N. 4.)

in dünner Schicht angefüllt, erst ca. 24 Stunden bei 28° C und weiter bei 23° C kultiviert. Die Kolben waren mit Baumwolle und Filtrierpapier mit Bleifaden verschlossen; oberhalb der dünnen Schicht der Nährlösung ist künstliche Lüftung überflüssig. Durch viele Versuche wurde sichergestellt, daß in den gefundenen Quantitäten Stickstoff nicht bemerkbar ist, ob die eintretende Luft wohl oder nicht durch Waschen mit Schwefelsäure von den Spuren von Stickstoffverbindungen gereinigt ist, was auch zu erwarten war auf Grund der kurzen Versuchsdauer und der sehr beträchtlichen assimilierten Stickstoffmengen. Auch gaben die schnell wachsenden und früh reifen Kulturen, worin der Zucker am ehesten verschwunden war, die besten Stickstoffausbeuten, was jedoch nicht für Reinkulturen gilt, welche im allgemeinen langsamer wachsen.

Die erste Impfung der Nährlösung geschieht mit frischer Gartenerde; bei den Ueberimpfungen braucht überhaupt keine Erde zugesetzt zu werden, doch beschleunigt ein kleiner Zusatz sterilisierter Erde zum Zwecke der Einführung einer kleinen Menge von Stickstoffverbindung das Wachstum stark. Schon nach der zweiten oder dritten Ueberimpfung sind die Amöben, Monaden und Infusorien beseitigt, und trotz des ziemlich komplizierten Bakterien-gemisches behält die Kultur während aller späteren Ueberimpfungen, wie eine Serie von mehr als 40 derselben zeigte, einen sehr gleichmäßigen, ausnahmslos mit Stickstoffbindung gepaarten Charakter.

Diese ganze Serie von mehr als 40 Ueberimpfungen wurde in der Mannitlösung gehalten (100 Leitungswasser, 2 Mannit, 0,05 K²HPO⁴). Eine größere Zuckerkonzentration wie 2 bis 4 Proz. hat sich für die Stickstoffbindung nicht als günstig erwiesen; selbst wenn mehr als 2 Proz. verwendet werden, dauert das Verschwinden sehr lange. Aus der Mannitlösung kann in Glukoselösung (2 Glukose anstatt Mannit) übergeimpft werden und besonders dann ist die Stickstoffausbeute günstig. Jedoch kann eine fortgesetzte Ueberimpfung in der Glukosenährflüssigkeit nicht stattfinden, weil dadurch entweder das rasche Ueberhandnehmen von säurebildenden aeroben Bakterien, von Aërobacter-Formen oder von Buttersäureferment, alles weitere Wachstum zum Stillstand bringt. Die wichtigsten der aeroben Säurebildner aus Glukose sind eben die all-gemeinsten aller Bakterien, nämlich die Fluorescenten (verflüssigende wie nicht verflüssigende) und die Aërobacter-Arten selbst. Ich muß darum betonen, daß die Verwendung unserer Nährlösung mit Mannit als Kohlenstoffquelle, worin nicht nur *Chroococcum*, welches unter allen Umständen, auch bei Gegenwart von Glukose ein kräftiger Alkalibildner ist, sondern auch die Fluorescenten nur Alkali erzeugen und die Buttersäurefermente schwierig oder nicht zur Entwicklung kommen, bei dieser Versuchsanstellung von prinzipieller Bedeutung ist und daß eben darauf die Einfachheit und Klarheit unserer Resultate beruht.

Wir haben dann auch unseren Kulturflüssigkeiten im allgemeinen keine Kreide zugesetzt, und in denjenigen Fällen, wo dieses, einer erwarteten Säurebildung entsprechend, wohl gethan

wurde, keine günstigen Resultate erzielt. Es muß selbst hervor-gehoben werden, daß bei allen schnell ablaufenden Versuchen, wo eine große Stickstoffausbeute erfolgte, keine freie Säure außer Kohlensäure nachweisbar war¹⁾ und daß stets, wenn freie Milch- oder Buttersäure in merklicher Menge auftraten, was durch die Gegenwart von Kreide nur unvollständig vorgebeugt werden kann, die Stickstoffbindung nur eine mäßige war.

Allerdings ist die Rohkultur von *Chroococcum* imstande, ein wenig freie Säure zu Kohlensäure und Wasser zu oxydieren. Wenn Buttersäure vorliegt, geschieht dieses unter starker Braunfärbung der *Chroococcum*-Häute, wodurch solche Kulturen sofort kenntlich werden. Aber auch dann ist die Stickstoffausbeute nicht besonders günstig.

Dagegen zeigt die Entwicklung von Kohlensäure und Wasserstoff durch *Granulobacter* und *Aërobacter*, wenn nicht zugleich Säure entsteht, einen günstigen Verlauf der Stickstoff-assimilation an. Oft werden dabei kleine Quantitäten Propyl- und Butylalkohol bemerkbar.

a) Die nichtsporenbildenden Begleiter von *Chroococcum* in den Rohkulturen.

Chroococcum erfüllt nach 3 oder 4 Tagen die ganze Masse der betrachteten Kulturflüssigkeit mit einem ziemlich durchsichtigen Bakterenschleim, worin man bei mikroskopischer Untersuchung viele sehr feine Stäbchen verschiedener Bakterien sieht, neben der plumpen und sofort kenntlichen Hauptart. Einen Einblick in das ziemlich bunte Artengemisch erhält man am schnellsten durch Aussaat einerseits auf Fleischbouillongelatine mit 3 Proz. Rohrzucker und Kultur bei 23°, andererseits auf reinem Agar, gelöst in Leitungswasser, Wasser mit 2 Proz. Glukose und 0,05 Proz. K^2HPO^4 .

Vermittelt des ersten Bodens, worauf *Chroococcum* gar nicht oder nur in ganz geringer Anzahl (als große wassertropfen-ähnliche Kolonien) zur Entwicklung kommt, erkennt man bei der Aussaat der Rohkulturen, trotz deren lange fortgesetzter Ueberimpfung in der stickstoffarmen Nährflüssigkeit mehrere Bakterienarten, jedoch in sehr ungleicher Anzahl. Bei weitem am allgemeinsten ist eine eigentümliche, sehr veränderliche Bakterienart, welche für unseren Zweck interessant ist, weil damit nicht nur bei der Symbiose mit *Chroococcum* (Vers. 39—44) beträchtliche Ausbeuten an assimiliertem Stickstoff erhalten wurden, sondern auch deshalb, weil die Gegenwart derselben in einigen Kulturen von *Granulobacter*-Arten (Vers. 28, 29) auch bei Abwesenheit von *Chroococcum* zu Stickstoffassimilation führte.

Sie erzeugt kleine, schleimige, weiche oder zähe, weiße, nicht verflüssigende, unter allen Umständen Alkali bildende Kolonien. Gewöhnlich findet man ein schillerndes Häutchen auf jeder Kolonie, was die Erkenntnis erleichtert, jedoch nicht sichert, weil ein ähn-

1) Natürlich könnte auch dann freie Säure gebildet sein, welche sofort durch die Mikroben oxydiert oder neutralisiert wäre.

licher Perlmutterglanz auf den Kolonien von *Aërogenes* und *Coli* beobachtet wird. In alten Eprouvettenkulturen entsteht auf der Oberfläche von Fleischgelatine eine irisierende Haut infolge der Alkalibildung, und zwar neben dem Impfstriche, was auch bei vielen anderen Bakterien, z. B. aus der *Fluorescens*-gruppe, gesehen wird, aber eben bei *Aërogenes* und *Coli* nicht vorkommt, welche nur auf den Kolonien selbst schillern. Der Glanz auf den Kolonien kann aber fehlen und dann wird die Erkennung schwieriger. Ueberdies ist die Form und Größe der Kolonien verschieden, und diese Verschiedenheit trägt erblichen Charakter. Ausgesät in Bouillon mit 0,02 Proz. Kaliumnitrit bemerkt man Denitrifikation, d. h. Schaumbildung durch freien Stickstoff. Diese Eigenschaft wäre sehr wertvoll für die Diagnose, wenn sie nicht in den Kulturen verloren gehen könnte. Der Verlust kam in meinen Kulturen nicht vor, als ich auf Fleischgelatine überimpfte, jedoch wohl bei der Aussaat in der stickstoffarmen Mannitlösung, und erst dann, als ich dieses wußte, erkannte ich die Allgemeinheit eben dieser Art, welche ich anfangs als ein Artengemisch betrachtet hatte. Auf dem Glukose-Agarkaliumphosphatboden werden die Kolonien ziemlich groß, besonders, wenn in Kontakt mit *Chroococcum*, und sind dann schwierig zu unterscheiden von *Aërogenes*, weil beide wässerige, ziemlich durchsichtige Ränder um die *Chroococcum*-Kolonien bilden, wenn mit diesen in Kontakt.

Sowohl die flüssigen Kulturen wie die Kolonien bestehen aus beweglichen und unbeweglichen feinen Stäbchen. Besonders die beweglichen können außerordentlich klein werden und erinnern dann lebhaft an die Schwärmer von *B. radicola*. Die unbeweglichen sind gewöhnlich größer, oft etwas gekrümmt und nicht selten zu sternartigen Ansammlungen vereinigt, ganz ähnlich den „Bakteriensternen“, welche ich früher ebenfalls für *Radicicola* beschrieben habe. Eben wie im letzteren Falle scheinen die sternartigen Ansammlungen hier durch einen eigentümlichen Verzweigungs- oder Teilungsmodus zu entstehen. Sie liegen vielfach, aber nicht immer, in einem dicken Schleime eingebettet. Oft fehlen sie gänzlich, und auch diese Veränderlichkeit erschwert die Erkennung dieser Art sehr. Wenn auch die Strahlenbildung durchaus nicht als eine konstante Erscheinung auftritt, halte ich das Vorkommen davon doch von morphologischem und systematischem Interesse und wählte darum für unsere Art den Namen *B. radiobacter*.

Findet Aussaat in Reinkultur statt in unserer stickstoffarmen Mannitlösung statt, so kann ein beträchtliches Wachstum eintreten, wodurch man den Eindruck bekommt, es könnte auf Stickstoffanhäufung geschlossen werden. Eine solche kann jedoch nur dann nachgewiesen werden, wenn zugleich *Chroococcum* in die Nährflüssigkeit gebracht ist. Findet in solchen gemischten Kulturen die Bildung eines zähen Schleimes statt, so bleibt das *Chroococcum*-Wachstum gering und auch dann konnte nur schwache Stickstoffassimilation beobachtet werden. Wenn dagegen das Bakteriengemisch weich und lose bleibt und, wie es dann immer der Fall

ist, vorwiegend aus *Chroococcum* besteht, ist dieses der Beweis, daß reichlich Stickstoff gebunden wird. In einem solchen Zustand verharteten z. B. die Kulturen der Versuche 43 und 44, wobei in einem Monat 70 mg Stickstoff pro Liter Kulturflüssigkeit gebunden war und 4 mg pro g verschwundener Mannit.

Gärung (außer Denitrifikation in Fleischbouillon mit 0,1 Proz. KNO₃) konnte bei *Radiobacter* nicht beobachtet werden, dagegen wohl ein größeres Maß von Mikroaërophilie bei der Kultur in zuckerhaltiger Nährlösung, wie wenn ohne Zucker kultiviert. Aus Zucker entsteht niemals Säure; dagegen wird unsere Kulturflüssigkeit durch *Radiobacter* immer schwach alkalisch. Organisch saure Salze werden mit großer Intensität zu Kohlensäure und Wasser oxydiert. Selbst Acetate ergaben sich als ernährungsfähig. Außerdem wurden mit positivem Erfolge Malate, Citrate, Propionate und Butyrate geprüft. Das Wachstumsoptimum liegt zwischen 25 und 27 ° C, doch ist Zimmertemperatur für die Stickstoffverbindung sehr geeignet.

Bei der Untersuchung der Aussaaten der Rohkulturen auf den Glukoseagarplatten trifft man sehr oft dünne, ebene, durchsichtige Kolonien an, welche aus den großen kleisterartigen *Chroococcum*-Kolonien hinauswachsen und zum Teil bis in ziemlich weite Entfernung. Sie können so durchsichtig sein, daß man sie erst nach genauer Betrachtung mit der Lupe bei durchfallendem oder reflektiertem Lichte erkennt. Anderenteils haben sie größere Vegetationskraft und liegen dann als etwas trübe Plättchen dem Agar angeschmiegt.

Mikroskopisch findet man darin kleine und dünne Kurzstäbchen, nur ganz vereinzelte davon beweglich. In allen Haupteigenschaften, wie in Bezug auf Enzymbildung und Ernährung besteht große Ähnlichkeit mit *Radiobacter*, nur ist es nicht gelungen, in Mischkulturen mit *Chroococcum* sicher Stickstoffbindung nachzuweisen, und ebensowenig konnte Denitrifikation beobachtet werden. Dennoch halte ich diese Bakterien für eine degenerierte Form von *Radiobacter* selbst.

Bei der Aussaat der *Chroococcum*-Rohkulturen auf Fleischgelatine mit Rohrzucker erkennt man nach einiger Uebung zwischen den *Radiobacter*-Kolonien hier und dort, bisweilen selbst allgemein, zwei Formen von *Aërobacter aërogenes*¹⁾ und überdies *Aërobacter coli*. Das eigentümliche Schimmern der *Radiobacter*-Kolonien wird auch bei diesen Arten gesehen, doch sind die *Aërogenes*- und *Coli*-Kolonien gewöhnlich beträchtlich größer wie diejenigen von *Radiobacter*. Auch auf Würzelgelatine wachsen sie leicht und viel üppiger wie *Radiobacter* und erzeugen dann oft Gasblasen. Da ich in Mischkulturen mit *Chroococcum* mittelst *Aërogenes* eine schwache Assimilation von freiem Stickstoff erzielte²⁾, will ich hier noch folgendes über diese Formen bemerken:

1) *Bacillus lactis aërogenes*.

2) Jedenfalls konnte, wie schon gesagt, weder mikroskopisch noch kulturell in diesen Mischkulturen irgend eine fremde Infektion erkannt werden.

Die in den Versuchen als Aërogenes 1 bezeichnete Varietät entspricht den gewöhnlichen Beschreibungen und erzeugt aus Rohrzucker neben Kohlensäure und Wasserstoff Milchsäure. In den Rohkulturen mit Glukose (Nährflüssigkeit 2) entsteht bei Gegenwart dieser Form soviel Säure, daß dadurch das Wachstum von *Chroococcum* ganz aufgehoben und damit nur in der Mannitlösung experimentiert werden kann. Die als Aërogenes 2 bezeichnete Form erzeugt in Rohrzuckerbouillon ebenfalls Kohlensäure und Wasserstoff, aber keine Milchsäure, sondern ein unbekanntes Alkali. In den Rohkulturen bleibt bei der Ueberimpfung diese Eigenschaft erhalten, doch gehen Gärkraft und Vermögen zur Alkalibildung schon nach zwei oder drei Ueberimpfungen bei der Reinkultur in Malzwürze verloren, wobei zu gleicher Zeit das Vermögen der Säurebildung entsteht. Hier liegt also ein typisches Beispiel von Accommodation an spezifische Ernährungsbedingungen vor. Ich muß hier noch bemerken, daß durchaus nicht jede willkürliche Isolierung von Aërogenes eine Form liefert, womit man zusammen mit *Chroococcum* Stickstoffassimilation erzielen kann, und daß selbst mit den angeführten Formen nicht alle Versuche gelungen sind, was zu einer wiederholten und genauen Untersuchung der wohl assimilierenden Kulturen veranlaßte, ohne daß es gelang, darin fremde Bakterien zu entdecken.

Wir hatten keine Ursache, aus den Rohkulturen noch andere Bakterienarten in Untersuchung zu ziehen; nicht daß wir durch die genannten Formen den ganzen Reichtum an diese Commensalen schon erschöpft hätten, sondern weil wir aus dem unregelmäßigen Vorkommen von vielen derselben schließen zu müssen glaubten, daß deren Bedeutung nur eine accidentelle sein könnte. Ganz bestimmt kann das z. B. behauptet werden in Bezug auf die Fluorescenten, wovon *Fl. non liquefaciens* nach zahlreichen Ueberimpfungen gänzlich verschwindet, während *Fl. liquefaciens* wohl nie verschwindet, aber oft nach einigen Transporten sehr zurücktritt, um dann aber plötzlich wieder einmal viel allgemeiner zu werden. Die große Schwierigkeit der Arterkennung bei den Bakterien schließt aber nicht aus, daß wir irgend eine wichtige Form übersehen haben, welche sich in der mehr speziell in Untersuchung gefundenen Hauptserie von mehr als vierzig Ueberimpfungen zufällig nicht vorfand. Doch muß ich hervorheben, daß zahlreiche andere kleinere Serien ebenfalls ziemlich genau bakteriologisch untersucht wurden und daß wir darin stets *Radiobacter* und *Aerobacter* neben *Chroococcum* erkannten.

b) Die aëroben sporenbildenden *Granulobacter*-formen als Begleiter von *Chroococcum* in den Rohkulturen.

Die vorstehend besprochenen Begleiter von *Chroococcum* sind sporenfrei und werden in pasteurisierten Rohkulturen nicht angetroffen. Sowohl in den gewöhnlichen Rohkulturen, wie in solchen, welche dadurch erhalten werden, daß die Nährlösung zu

gleicher Zeit mit pasteurisierter Erde und *Chroococcum* geimpft sind, finden sich jedoch noch eine Reihe von Sporenbildern, welche, soweit sie auf die Dauer infolge ihrer Stickstoff-assimilation bei den Ueberimpfungen standhalten, zur Gattung *Granulobacter* gehören. Dieselben sind meistens „aërob“, doch gehören auch die sogenannten „anaëroben“ Butyl- und Buttersäurefermente hier her, welche jedoch im nächsten Paragraphen gesondert besprochen werden sollen. Die Worte „aërob“ und „anaërob“ verwenden wir hier im gebräuchlichen Sinne, doch muß bemerkt werden, daß alle *Granulobacter*-Arten mehr oder weniger „mikroaërophil“ sind¹⁾, die Butyl- und Buttersäurefermente so stark, daß sie bei vollem Luftdruck gar nicht mehr wachsen, die übrigen in geringerem Maße, so daß sie zwar aërob isoliert und kultiviert werden können, doch vertragen sie den vollen Luftdruck auf die Dauer nicht gut und verlieren dabei mehr oder weniger ihre ursprünglichen Eigenschaften. Für die beweglichen Formen läßt die Mikroaërophilie sich hier besonders schön nachweisen, dadurch, daß sie sich in mikroskopischen Präparaten, nach Art der Spirillen, in einer vom Meniscus entfernten, einem geringeren Sauerstoffdruck entsprechenden „Atmungslinie“ ansammeln.

Der Nachweis dieser Arten in den mit frischer Erde angestellten Rohkulturen ist gewöhnlich leicht, doch wird dieses in den Ueberimpfungen allmählich schwieriger, und nach vielen Transporten verdrängen *Radiobacter* und die anderen nicht sporenbildenden Begleiter von *Chroococcum*, *Granulobacter* so vollständig, daß dessen Nachweis unter dem Mikroskop mißlingt und selbst kulturelle Methoden nicht zu einem Resultate führen.

Dagegen gelingt deren Isolierung leicht, wenn man ausgeht von den oben in zweiter Linie genannten Methode der partiellen Rohkultur, welche darin besteht, daß die Mannitnährlösung zugleich mit pasteurisierter Erde und *Chroococcum* geimpft wird. Das Pasteurisieren geschieht durch Erhitzen auf 85° C der in Wasser suspendierten Erde während 5 Minuten. Sobald die bei 28° C geführten Kulturen dann eine gut entwickelte *Chroococcum* haut zeigen, was beweist, daß die Stickstoffbindung in vollem Gange ist, werden Impfstiche gezogen auf Glukosephosphatagar²⁾, also auf demselben Boden, worauf früher *Chroococcum* selbst isoliert wurde, und diese werden gleichfalls bei 28° C gestellt. Wir isolierten auf diese Weise 5 zu *Granulobacter*³⁾ gehörige Formen, welche jede zusammen

1) Anaëroben im strengen Sinne des Wortes giebt es, wie ich anderswo gezeigt habe, überhaupt nicht, — auch die sogenannten Anaëroben bedürfen freien Sauerstoff.

2) Solche aus 2 g Agar, 2 g Glukose und 0,05 g K^*HPO^4 in 100 ccm Leitungswasser angefertigten Platten sind nach dem Erstarren in der Glasdose sehr feucht, darum werden sie in festem Zustande so lange vorsichtig und langsam erhitzt, bis ihre Oberfläche ganz trocken ist. Die wenigen auf diese Weise verdunsteten Wassertropfen kondensieren am Deckel der Glasdose und werden von dort abgewischt.

3) Für die Beschreibung dieser Gattung verweise ich auf meine Arbeit *Sur la fermentation et les ferments butyliques*. (Arch. Néerlandaises. T. XXIX. 1896. p. 10.)

mit *Chroococcum* Stickstoff anhäufen. Sie sind ziemlich nahe verwandt und können vielleicht auf ein oder zwei Arten zurückgeführt werden.

Es hat sich nämlich herausgestellt, daß die zuerst von den Rohanhäufungen isolierten Formen bei der fortgesetzten Ueberimpfung in den Reinkulturen ihren ursprünglichen Charakter mehr oder weniger vollkommen verlieren, wodurch Konvergenz der verschiedenen Formen zu einer Limitform stattfindet, welche jedoch durch keine derselben erreicht wird.

Die Ursache dieser Umwandlung ist darin zu suchen, daß der Druck des atmosphärischen Sauerstoffs auf die Dauer nicht von diesen Organismen vertragen wird, während alles, wodurch dieser Druck vermindert wird, auch die Abänderungsschnelligkeit verlangsamt. Dieses ist z. B. dadurch zu erreichen, daß die Reinkulturen von Anfang an zusammen mit stark aërophilen Arten, z. B. mit *Chroococcum* + *Radiobacter*, fortgeführt werden. Aber auch auf diese Weise kann der Umwandlung der ursprünglichen Eigenschaften nicht ganz vorgebeugt werden, so daß unter allen Umständen aus den Reinkulturen schließlich etwas Unähnliches entsteht.

Nach den verwandtschaftlichen Beziehungen lassen die 5 für unsere Versuche verwendeten aëroben Formen sich, wie folgt, anordnen:

<i>Granulobacter polymyxa</i> ,	
„	„ var. <i>tenax</i> ,
„	„ „ <i>mucosum</i> ,
„	<i>sphaericum</i> ,
„	<i>reptans</i> .

Gr. polymyxa. Diese im Boden sehr allgemein verbreitete Art habe ich schon in meiner Abhandlung über die Butylalkoholgärung beschrieben¹⁾ und seitdem habe ich dieselbe sehr oft unter allerlei Bedingungen zurückgefunden. Wahrscheinlich ist *B. solaniperda* Kramer²⁾ damit identisch oder eine ganz nahestehende Varietät. In Malzwürze wird durch *Polymyxa* eine kräftige und lange dauernde Gärung verursacht, wobei eine schleimige Kultur entsteht, die sich durch das beinahe gänzlich aus Kohlensäure zusammengesetzte Gärungsgas stark aufbläht und sich mit einer zähen, lange haltenden Schaumschicht bedeckt. Dieser Schaum besteht aus beweglichen Stäbchen und aus sporenführenden, schmalen Clostridien, welche nur wenig Granulose enthalten. Er erzeugt auf Würzelgelatine zunächst durchsichtige, dünn aufliegende Kolonien, welche später energisch verflüssigen und dann *B. mesentericus vulgatus* sehr ähnlich sind.

Ich habe diese Art seit vielen Jahren als einen gewöhnlichen Aëroben fort kultiviert und eben mit einem solchen alten Stamme bei der Symbiose mit *Chroococcum* regelmäßig eine merkliche Stickstoffbindung beobachtet (Versuch 45), während die Reinkultur

1) Fermentation et ferments butyliques. (I. c. Mit Abbildung.)

2) Migula, System der Bakterien. Bd. II. 1900. p. 573.

ohne *Chroococcum* in der stickstofffreien Nährlösung nur ausnahmsweise (vergl. § 5) zur Entwicklung kommt. Nitrate werden energisch reduziert zu Nitriten und Ammonsalzen, aber nicht zu Stickstoff. Sie sind bei Gegenwart von Zucker eine gute Stickstoffquelle; doch können auch die Nitrite und Ammonsalze als solche fungieren. Alle diese Stickstoffverbindungen werden in viel höheren Konzentrationen vertragen wie durch *Chroococcum*, so daß aus einem Gemisch beider Arten in stickstofffreier Nährlösung letztere verschwindet durch Hinzufügung selbst von geringen Quantitäten (z. B. 0,1 Proz.) solcher Stickstoffkörper.

Die beiden als *Tenax* und *Mucosum* bezeichneten Varietäten von *Polymyxa* sind aus unfruchtbarem Haidesand aus der Nachbarschaft von Wageningen isoliert, worin dieselben reichlich vorkommen¹⁾. *Tenax* wurde so genannt, weil sie fest mit dem Agar verwächst und nur schwierig mit dem Platinfaden davon entfernt werden kann. *Mucosum* liegt dagegen als dicker loser Schleim auf der Glukoseagarplatte und hat dann viel Ähnlichkeit mit *Chroococcum*, nur daß die Kolonien von dem letzteren kleisterartig trübe, diejenigen von *Mucosum* mehr durchsichtig sind. Mikroskopisch findet man bei *Tenax* und *Mucosum* Stäbchen und schmale Clostridien mit länglichen Sporen (Versuch 47 und 48).

Granulobacter sphaericum. Diese interessante Bakterie wurde in der ersten Mitteilung über Oligonitrophilen schon kurz beschrieben²⁾. Seitdem habe ich damit viele Versuche angestellt und zahlreiche neue Isolierungen ausgeführt.

Die kleinen, beinahe sphärischen oder birnförmigen Clostridien mit länglichen Sporen werden nur bei der Isolierung aus solchen Rohkulturen erhalten, welche mit Erde (oder Dünsand etc.) am besten nach vorheriger Erhitzung auf 85° C infiziert sind; bei den Ueberimpfungen werden die Clostridien dünner und länger. Lange an der Luft kultiviert, geht die Wachstumsfähigkeit bei manchen Stämmen ganz verloren. In anderen Fällen ist die Form viel stabiler und nähert sich dann mehr der vorigen Art; auch sind bei dieser weniger variablen Form die Sporen und Clostridien größer. Am wenigsten verändern sich die Kulturen auf fester Grundlage, wenn symbiotisch kultiviert mit *Chroococcum* + *Radiobacter* auf stickstoffarmem Glukoseagar, wobei ein üppiges Wachstum und starke Schleimbildung bei allen drei Species beobachtet wird. Auf Würzegeatine konnte ich niemals Wachstum beobachten. Die Kolonien auf Glukoseagar haben Neigung, seitlich auszuwachsen und sich zu verzweigen und erinnern stark an *B. subtilis*.

1) Viele Muster von Haidesand aus jener Gegend von verschiedener Tiefe herstammend erhielt ich von meinem Freunde Dr. O. Pitsch. In keinem einzigen davon konnte *A. chroococcum* nachgewiesen werden. Mit den daraus stammenden *Granulobacter*-Formen konnte ich nur dann Stickstoffbindung beobachten, wenn in der Kulturflüssigkeit zugleich *A. chroococcum* vorkam, und ich suchte vergebens andere Arten aus dem Sande zu isolieren, welche zusammen mit *Granulobacter* Stickstoff binden konnten.

2) Centralbl. f. Bakt. l. c. p. 564.

Die Veränderlichkeit von *Gr. sphaerium* steht in nahem Zusammenhang mit der Mikroaërophilie, welche hier ziemlich stark ausgeprägt ist. Gänzlich anaërob ist die Form durchaus nicht, wie schon aus der sehr einfachen Isolierung an der Luft erhellt, doch verlieren die Kulturen, bei vollem Luftzutritt gehalten, ihre Eigenschaften, besonders bald das Gärungsvermögen und die Neigung zur Clostridienbildung. Auch die Intensität, womit in Gemeinschaft mit *Chroococcum* der freie Stickstoff gebunden wird, wird unter dem Einfluß lange einwirkender Lüftung geringer, doch geht das Vermögen nicht verloren, und wenn nur Zeit da ist, sind die Ausbeuten nur wenig geringer, wie mit frischen Kulturen.

Frisch isolierte Stämme, mit *Chroococcum* in der stickstofffreien Glukosenährlösung kultiviert, produzieren neben einem Gemisch von Propyl- und etwas Butylalkohol ein höchst angenehmes Aroma von spezifischer Natur. Wasserstoff und Kohlensäure entstehen dabei in geringer Quantität. Das mikroskopische Bild solcher Kulturen ist überraschend wegen des profusen Wachstums der beiden Arten, wovon unter nicht näher bekannten Bedingungen *Chroococcum* zum Stillstand kommen und selbst so gut wie vollkommen durch *Gr. sphaericum* verdrängt werden kann. Dennoch können auch solche Kulturen eine hohe Stickstoffausbeute ergeben, woraus ich ableite, daß *Gr. sphaericum* an und für sich und ohne *Chroococcum* imstande sein muß, den freien Stickstoff zu binden und die dabei entstehende Verbindung auch selbst fürs Wachstum zu verwenden. Warum dabei die Gegenwart von *Chroococcum* eine so günstige Bedingung ist, ist noch nicht aufgeklärt. Gewiß handelt es sich hierbei noch um eine andere Beeinflussung wie Sauerstoffentziehung allein. Denn wäre dieses nicht der Fall, so würden auch wohl andere Bakterien imstande sein, die Rolle von *Chroococcum* zu übernehmen. Durch viele Versuche haben wir uns jedoch überzeugt, daß dieses nicht gelingt. So wurden die folgenden Kombinationskulturen, sowohl in Mannit- wie Glukoselösungen untersucht, und zwar alle mit negativem Resultat; *Sphaericum* + *Mesent. vulgatus*, *Sphaericum* + *Subtilis*, *Sphaericum* + *Aërogenes* 1, *Sphaericum* + *Fluorescens non liquefaciens*, *Sphaericum* + *Aërogenes* 2, *Sphaericum* + *Radicicola* (aus Weißklee), *Sphaericum* + *Radiobacter*. In keinem einzigen Falle war Wachstum von irgend welcher Bedeutung bemerkbar, trotzdem die Kulturen monatelang aufbewahrt wurden. Auch wurde vielfach versucht, durch beschränkten Luftzutritt solche Kombinationskulturen oder auch die Reinkulturen von *Sphaericum* allein besser wachsen zu lassen, jedoch immer vergebens. Nur der Zusatz von *Chroococcum* konnte Wachstum und Stickstoffbindung anregen.

Sphaericum ist eine sehr allgemein verbreitete Bakterie, welche auch im Leitungswasser vorkommt, so daß, wenn unsere gewöhnlichen Mannit- oder Glukoselösungen nur einfach gekocht und nicht sterilisiert waren, darin gebrachte Aussaaten von *Chroococcum* oft kräftig wuchsen, sich dann jedoch immer als infiziert mit dieser oder einer anderen *Granulobacter*-Art ergaben.

Granulobacter reptans. Diese ist eine Zwischenform zwischen letzterer Art und *Gr. polymyxa* und ist auf ähnliche Weise wie *Gr. sphaericum* in Reinkultur zu erhalten, nämlich aus unserer gewöhnlichen stickstofffreien Nährlösung, nachdem diese infiziert ist mit pasteurisierter Gartenerde + *Chroococcum*. Sobald kräftiges Wachstum begonnen hat, werden Impfstiche auf Glukoseagar gezogen, wobei, wie im vorigen Falle, stark verzweigte dünn aufliegende, weit umherkriechende Kolonien entstehen. Es ist aber auch möglich, aus den Kulturen von pasteurisierter Erde + *Chroococcum* auf Platten von Würzelatine, worauf *Sphaericum* nicht wächst, die eigentümlichen Kolonien von *Reptans* zu erhalten, welche eben auf diesem Boden leicht kenntlich sind. Dieselben bilden darauf dünne plattenartige, lange fortwachsende Massen von ziemlich fester Konsistenz, welche aus Stäbchen und länglichen, sporenführenden Clostridien bestehen. Sie färben sich mit Jod dunkelblau oder tiefviolett. In Würzelösung verursacht *Reptans* eine starke Gärung, ganz ähnlich wie *Polymyxa*. Die Stäbchen dieser Gärung ordnen sich unter dem Deckglas in den Atmungsfiguren wie Spirillen, jedoch in viel weiterer Entfernung vom Meniscus, als wie Spirillen es thun würden, wodurch sie ihre stark ausgeprägte Mikroaërophilie kundgeben. Lange in flüssiger Würze fortgeführte Kulturen verflüssigen bei erneuter Aussaat Würzelatine energisch, während die frischen Isolierungen wochenlang darauf ohne Verflüssigung fortwachsen.

Obschon feststeht, daß in den reich gelüfteten Rohkulturen bei der Symbiose von *Chroococcum* mit den aërob kultivierbaren *Granulobacter*-Arten sehr viel Stickstoff gebunden wird, bin ich doch überzeugt, daß diese Arten desto aktiver sind, je stärker ihre Mikroaërophilie ausgeprägt ist, was sich beurteilen läßt durch die Entfernung der „Atmungslinie“ im mikroskopischen Präparate vom Meniscus. Jedenfalls hat sich herausgestellt, daß frisch isolierte, stark mikroaërophile Stämme von *Sphaericum* und *Reptans* in derselben Zeit mehr Stickstoff festlegen, wie die gleichen Stämme, nachdem sie durch längere aërobe Kultur mehr aërophil geworden sind. Ganz verloren geht ihre spezifische Aktivität jedoch nicht, selbst nicht nach zweijähriger aërober Kultur.

c) Die anaëroben Buttersäure- und Butylfermente der Rohkulturen.

Obschon der Hauptzweck dieser Abhandlung der Nachweis der Stickstoffbindung in den aëroben Kulturen ist, erfordert die Deutlichkeit einige Angaben über die mit den echten anaëroben Arten von *Granulobacter* erhaltenen Resultate. Die hier in Betracht kommenden Formen sind bei einer früheren Gelegenheit als *Gr. butylicum* und *Gr. saccharobutyricum* beschrieben¹⁾. Allerdings sind die Kulturen, welche diesen Beschreibungen zu Grunde gelegen haben, bei Versuchen mit Mehlmaischen erhalten und liegt

¹⁾ Fermentation et ferments butyliques. (Archives Néerlandaises. T. XXIX. 1896. p. 7.)

eine vollständige Identität derselben mit den in unseren Rohkulturen gefundenen Buttersäure- und Butylfermenten nicht vor. So kann z. B. eine Mehlmalsche nicht sofort durch eine Rohkultur in unserer Glukosenährlösung, welche aus *Chroococcum* + Buttersäureferment besteht, in Buttersäuregärung versetzt werden, dafür fehlt die notwendige Accommodation¹⁾, und dasselbe gilt in Bezug auf das Butylferment. Im übrigen sind aber die bei diesen so verschiedenen Kulturbedingungen auftretenden Formen so durchaus identisch, daß nicht daran gedacht werden kann, auf die Accommodationsverschiedenheit neue Arten oder selbst nur Varietäten zu gründen. Es ist denn auch meine volle Ueberzeugung, daß es die gleichen Sporen sind, welche bei der Infektion mit Gartenerde einerseits von Mehlmalschen, andererseits von unserer Glukosenährlösung für Stickstoffanhäufung, Buttersäuregärung oder, wenn zu Butylicum gehörig, in beiden Nährmedien die Propyl-Butylalkoholgärung hervorrufen, und daß erst unter diesen spezifischen Ernährungsbedingungen die Accommodation entsteht, welche eben genannt wurde und die also bei den in der Gartenerde vorkommenden Sporen noch fehlt.

Wir sind in Bezug auf die Bindung des freien Stickstoffs durch das Buttersäureferment prinzipiell zu demselben Resultate gekommen wie Winogradsky²⁾, der dem Agens dieser Gärung den Namen *Clostridium Pasteurianum* gegeben hat, doch besteht zwischen seinen und unseren Erfahrungen eine Divergenz in Bezug auf die begleitenden Bakterien, welche die Stickstoffbindung in den Buttersäuregärungen ermöglichen. Nach seinen Angaben handelt es sich dabei einfach um Sauerstoffentziehung, welche sehr gut durch die sporenbildenden aeroben Arten, welche in pasteurisierter Erde neben dem Buttersäureferment lebendig bleiben, würde geschehen können. Wir konnten dagegen niemals befriedigende Kulturen erhalten, so lange wir daran festhielten, die von Winogradsky gegebene Vorschrift, die für die Infektion verwendete Erde zu pasteurisieren, zu befolgen. Zwar stellten sich dabei sehr oft thatsächlich Buttersäuregärungen in unseren Nährflüssigkeiten ein, aber diese kamen immer bald zum Stillstand, wie überhaupt alles weitere Wachstum. Dieses Verhalten änderte sich nicht, wenn für die Ueberimpfungen Nährlösungen mit Rohrzucker oder Mannit, mit oder ohne Zusatz von Kreide, anstatt Glukose verwendet wurde, und ebensowenig, wenn noch überdies allerlei andere gewöhnliche, nicht sporenbildende Bakterien, wie *Radicalicola*, *Fluorescens liquefaciens*, *Fluorescens non liquefaciens*, bei der Infektion zugesetzt wurden. Nur die gleichzeitige Gegenwart von *Chroococcum* veränderte das Verhalten völlig, die Buttersäuregärung konnte dann regelmäßig fortschreiten, bis aller Zucker verschwunden war und es

1) Es ist hier nicht die Stelle, auf die schwierige und außerordentlich wichtige Frage der Accommodation bei den Bakterien näher einzugehen. Diese muß für spätere Mitteilungen vorbehalten werden.

2) Assimilation de l'azote libre l. c.

wurden Stickstoffausbeuten erlangt, ganz ähnlich den von Winogradsky gefundenen, das ist von 3 mg gebundenem Stickstoff pro g verschwundenem Zucker, und selbst noch mehr. In vielen solchen Fällen konnte nach einigen Ueberimpfungen bei sorgfältiger kultureller Untersuchung keine einzige andere aeröbe Bakterie gefunden werden wie *Chroococcum* und keine andere anaeröbe wie das Buttersäureferment.

Solche in Bezug auf Buttersäurebildung und Stickstoffausbeute produktive Kulturen zeichneten sich immer dadurch aus, daß die auf der Oberfläche der Lösung treibende *Chroococcum*-Haut sich schließlich tiefbraun bis schwarz färbte, während gleichzeitig die Buttersäure und das anfangs gebildete Calciumbutyrat gänzlich verschwanden, unter Bildung von Calciumkarbonat, welche Oxydation aber durch *Chroococcum* besorgt wird. In diesem Oxydationsvorgange, wofür wir keine andere geeignete Bakterienart, wie *Chroococcum* allein gefunden haben, zusammen mit der für die Anaerobiose des Buttersäurefermentes notwendigen Sauerstoffabsorption, sehen wir jedenfalls die Hauptbedeutung, wenn auch nicht die einzige Bedeutung, jener Bakterie für die Stickstoffbindung durch letzteres Ferment.

Bei unseren Infektionsversuchen mit pasteurisierter Gartenerde ist es oft vorgekommen, daß überhaupt keine Buttersäure-, sondern Propyl-Butylalkoholgärung¹⁾ sich eingestellt hat, sowohl in der Glukose- wie in der Mannitnährlösung. In solchen Fällen konnten die sporenbildenden aeroben Begleitbakterien auch bei Abwesenheit von *Chroococcum* zu einem beträchtlicheren Stickstoffgewinn Veranlassung geben, wie wenn Buttersäure gebildet wurde. Aber auch in diesem Falle hat die Gegenwart von *Chroococcum* einen so prononciert günstigen Effekt ausgeübt, daß wir keine Veranlassung hatten, uns in die Verhältnisse bei Abwesenheit dieser Art zu vertiefen. Endlich haben manche Rohinfizierungen mit Gartenerde, welche nicht einmal pasteurisiert war, Kulturen erzeugt, worin zwar die äußeren Anzeichen der Buttersäure- und Propyl-Butylgärung fehlten, mikroskopisch aber Bacillen und Clostridien in geringer Anzahl gefunden wurden, welche als die Agentien jener Gärungen aufzufassen waren und eben in diesen Versuchen, wobei zu gleicher Zeit ein außerordentlich lebhaftes Wachstum von *Chroococcum* und *Radiobacter* bemerkt wurde, sind sehr hohe Stickstoffausbeuten erzielt (Vers. 15 und 17).

Hat sich bei dieser Versuchsanstellung eine kräftige Buttersäuregärung entwickelt, so giebt ein Kulturtropfen für die Beobachtung der Atmungslinie in die Glaskammer²⁾ gebracht, ein

1) Ich war früher der Meinung, daß diese Gärung der Hauptsache nach Butylalkohol erzeugt und gab (l.c.) dem Agens unter diesem Eindruck den Namen *Gr. butylicum*. Doch hat sich später herausgestellt, daß der Alkohol der Hauptmasse nach Propylalkohol ist.

2) Meine Glaskammer unterscheidet sich von den schon beschriebenen dadurch, daß das Präparat sich an der Unterseite des Objektglases befindet, welches deshalb so dünn sein muss, wie das Deckglas; das Deckglas selbst wird durch Kapillarität vor dem Abfallen bewahrt. Die Einrichtung ist, wie folgt: Ein

sehr überzeugendes Resultat, einerseits durch die Entstehung einer ausgezeichnet scharfen Anhäufungslinie der sehr beweglichen mikro-aërophilen Stäbchen in beträchtlicher Entfernung vom Meniscus, andererseits durch das intensive Wachstum von *Chroococcum* im Meniscus selbst, auf Kosten der durch das Buttersäureferment erzeugten Stickstoffverbindung. Wenn eine Kultur des anaëroben Butylfermentes vorliegt, gelingt dieser Versuch durchaus nicht mit gleicher Eleganz.

Da die bei unseren Versuchen auftretenden Buttersäure- und Butylfermente beträchtliche Verschiedenheiten gezeigt haben, erscheint es möglich, daß die hier vorkommenden Varietäten sich anders verhalten, wie diejenigen von anderen Orten.

Ehe wir diese Betrachtung abschließen, wünschen wir noch hervorzuheben, daß wir in denjenigen Rohkulturen, wo frische Gartenerde für die Infektion verwendet war, so daß alle in unseren Nährlösungen entwicklungsfähigen Bakterien sich hatten vermehren können, die folgende Erscheinung beobachtet haben: Es kommt bei der aëroben Kultur oft vor, daß die sich ruhig überlassenen, nicht geschüttelten Rohkulturen, wenn fortwährend unter 28° C gehalten, schließlich gänzlich „gelatinieren“, infolge der profusen Schleimbildung durch *Chroococcum*¹⁾. Dieser Schleim hat zwei bemerkenswerte Eigenschaften: Fehling'sche Lösung wird dadurch zuerst gelb, später, durch Ausscheidung von metallischem Quecksilber schwarz gefärbt, was auf reduzierende Eigenschaften hinweist. Zweitens ist derselbe fähig, in Buttersäuregärung versetzt zu werden, wobei die gelatinierte Masse unter Gasbildung gänzlich verflüssigt wird. Weil Cellulose von dem Buttersäureferment nicht angegriffen wird, dagegen wohl die Pektinkörper der Zellwand, dürfte geschlossen werden, daß der *Chroococcum*-Schleim aus den letzteren besteht. Es kann leicht nachgewiesen werden, daß bei der Verflüssigung der Pektinschicht der gewöhnlichen Zellwand bei höheren Pflanzen durch Buttersäureferment, ein spezifisches durch letzteres Ferment abgesondertes Enzym, die Pektinase, wirksam ist. Das gleiche Enzym dürfte in diesem Falle also verflüssigend auf den *Chroococcum*-Schleim wirken.

kleiner viereckiger Glasrog von 6 cm Länge bei 4 cm Breite und 1 cm Tiefe kann mit einer Platte von Deckglasdicke gänzlich abgeschlossen werden. Der Kultur- oder Mikroskopiertropfen befindet sich auf der Unterseite jener Platte und ist durch ein gewöhnliches großes Deckglas abgedeckt, jedoch in der Weise, daß durch einen zwischengeschobenen Platinfaden zwischen dem hängenden Deckglas und der dünnen Objektplatte ein keilförmiger Raum entsteht (wie ich das im Centrabl. f. Bakt. Bd. IV. 1893. p. 827 abgebildet habe), worin die Mikrobien, sei es durch Bewegung, sei es durch Wachstum, sich an derjenigen Stelle anhäufen, wo der Sauerstoffdruck für die betreffende Art optimal ist. Der Glasrog wird mit etwas Wasser angefüllt, um dem Verdunsten des Mikroskopiertropfens vorzubeugen, und die ganze Kammer wird ihrerseits wieder in eine Glasdose gestellt, worin sich ebenfalls Wasser befindet. Eine solche Kultur kann, ohne zu vertrocknen, wochen- oder monatelang fortgesetzt werden. Die ganze Einrichtung liefert die Instrumentalienhandlung J. W. Giltay, Delft.

1) Dieser Schleim besteht (wie im Centrabl. f. Bakt. etc. II. Abt. Bd. VII. 1901. p. 567 gezeigt wurde) aus der stark angeschwollenen Zellmembran jener Art. Eine äußerlich ganz ähnliche Schleimbildung kann in unserer Nährlösung auch durch *Bac. radicola* und *Radiobacter* entstehen, doch sind die chemischen Eigenschaften dieses Schleimes davon verschieden.

2. Stickstoffgewinn in den Rohkulturen von *Chroococcum*.

Für die Stickstoffbestimmung wurde die Methode Kieldahl benutzt, und zwar wegen des Gehaltes an Spuren von Nitraten in der bei mehreren Versuchen zugesetzten Gartenerde die Jodlbauer'sche Abänderung derselben¹⁾.

Zur Erhaltung einer für die Verbrennung mit Schwefelsäure gut geeigneten Masse wurde die Bakterienkultur mit einigen Tropfen basischem Bleiacetat präcipitiert und filtriert, und Präcipitat samt Filter getrocknet und verbrannt, während das Filtrat weggeworfen wurde.

Es hat sich herausgestellt, daß hierbei zwar ein wenig des gebundenen Stickstoffs verloren geht, so daß unsere Zahlen immer etwas unter den wirklich erhaltenen Ausbeuten bleiben, doch ist die Differenz unbedeutend, während die Zeitersparung sehr groß ist, weil das schwierige Eindämpfen im Vakuum vermieden wird.

Hier folgt nun zunächst eine als „Blanco“ eingeschaltete Angabe über die Korrektur, welche jeweils anzubringen war wegen des Stickstoffgehaltes in den für die Analyse verwendeten Materialien: Phenolschwefelsäure, Zinkstaub, Quecksilber, Natronlauge und Schwefelsäure. Und zweitens eine Korrektur für den Stickstoffgehalt von den Filtern, der Erde und dem Wasser, welche alle mehrfach analysiert wurden. Durch Multiplikation der Kubikcentimeterzehntel Normalschwefelsäure mit 1,4 findet man das entsprechende Gewicht an Stickstoff in Milligrammen. So war in der von uns verwendeten lufttrockenen sterilisierten Erde $4 \times 1,4 = 5,6$ mg N pro Gramm gegenwärtig, während unser Leitungswasser 0,42 mg N pro Liter, unser Mannit 2,8 mg pro Gramm enthielten, während unser Rohrzucker und Glukose stickstofffrei waren.

	$\text{ccm} \frac{\text{N}}{10} \text{SO}^4\text{H}^2$		Differenz	Differenz vermindert mit Blanco
	vor der Destillation	nach der Destillation		
Blanco	20,6	19,9	0,7	
Erde, 1 g	20,6	15,9	4,7	4
Erde, 1 g	20,6	15,9	4,7	4
2 Filter, 3 g	20,6	19,2	1,4	0,7
Leitungswasser, 1 l	20,6	19,6	1,0	0,3
Mannit, 2 g	20,6	19,7	0,9	0,2
Rohrzucker, 2 g	20,6	19,9	0,7	0,0
Glukose, 2 g	20,6	19,9	0,7	0,0

1) Nederlandsche Staatscourant. 1899. No. 277. Das getrocknete Filter wird verbrannt mit 15 ccm Phenolschwefelsäure (100 Phenol + 900 SO^4H^2 von 1,8). Nach einiger Zeit werden noch zugesetzt 2 g Zinkstaub, 2 ccm concentrierter SO^4H^2 , und ein Tropfen Hg, von ca. 1 g. Vor dem Verbrennen einige Zeit stehen lassen, um Schaumbildung zu vermeiden. Das Verbrennen auf dem Sandbade dauert 4–5 Stunden. — Die Masse wird in einen Literkolben übergespült, es wird 125 Lauge (500 g NaHO + 10 g Na^2S pro Liter) und noch überdies 25 ccm Na^2S (250 g Na^2S pro Liter) zugesetzt mit 2 Stückchen Zink destilliert und das Destillat in $\frac{\text{N}}{10} \text{SO}^4\text{H}^2$ aufgefangen.

Wir geben nun in Tabellenform eine Uebersicht zuerst der mit den Rohkulturen erzielten Stickstoffausbeuten, wobei immer wenigstens 24 Stunden auf 28° C und dann weiter bei 23—25° C kultiviert wurde.

Um nachzuweisen, ob am Ende des Versuches noch Glukose oder Mannit übrig sind, wird, wie folgt, verfahren:

Glukose. Man bringt in einer dünnen Reagentienröhre etwas Methylenblau mit Kalilauge zum Sieden, und läßt aus einer Glasröhre unten in die heiße Flüssigkeit einige Tropfen der zu untersuchenden Lösung fließen: Ist noch Glukose vorhanden, so entfärbt sich das Methylenblau momentan durch Reduktion.

Mannit. Einen Tropfen der zu untersuchenden Flüssigkeit läßt man auf dem Objektträger eindampfen. Bei Gegenwart von Mannit entsteht ein charakteristischer weißer Ring von Krystallnadeln am Rande des Tropfens.

Etwa vorhandene Milchsäure wurde nachgewiesen durch die schöne Yttriumreaktion von Prof. J. Behrens, Delft. Dazu wird die Milchsäure mit Aether ausgeschüttelt: es wird in ein Uhrglas der Aether abgedunstet, mit Ammon neutralisiert und ein wenig eines Yttriumsalzes zugesetzt: Milchsäure präcipitiert dabei als höchst charakteristische, stark doppelbrechende Mikrosphaerite von Yttriumlaktat.

Buttersäuregärung war bei diesen Versuchen ausgeschlossen, doch können Anaëroben vorhanden gewesen sein, als vereinzelte Keime in allen Versuchen mit Rohkulturen, bei manchen derselben in reichlicher Anzahl, doch ist deren Unterscheidung von *Polymyxa*, *Reptans* und *Sphaericum* mikroskopisch und kulturell schwierig und nur bei reichlicher Gegenwart derselben durchzuführen. In allen diesen Versuchen ist der gebundene Stickstoff der Hauptsache nach als Bakterieneiweiß in den *Chroococcum*-Zellen aufgespeichert, denn wenn auch die Zellen von *Granulobacter* und *Radiobacter* prozentual viel reicher an Eiweiß sind, wie diejenigen von *Chroococcum*, so ist doch deren Anzahl zu gering, um im Endresultat den Durchschlag zu geben.

(Siehe Tabelle Seite 22 und 23.)

In Bezug auf die Versuchseinrichtung sei noch folgendes bemerkt:

Für den Anfangsversuch diene als Infektionsmaterial frische Gartenerde. Die dabei erhaltenen Rohkulturen waren strotzend mit *Chroococcum* gefüllt und dienten für die Ueberimpfung. Diese letztere wurde dann wiederholt und so eine ganze Serie von Kulturen erhalten, wobei natürlich jede Kultur für viele Parallelserien Ausgang werden konnte. Die getrocknete Erde, welche später durch sterilisierte ersetzt wurde, diene überall als Stickstoffnahrung, wodurch die Entwicklung der Kulturen beschleunigt wird. Wie man sieht, wurden dadurch gewöhnlich ca. 3 mg N in 200 oder 300 ccm Nährlösung eingeführt.

Wir fassen das Resultat der Stickstoffbestimmungen in den Rohkulturen wie folgt zusammen:

Stickstoffgewinn in Rohkulturen.

Kulturflüssigkeit 1: Leitungswasser 100 Kulturflüssigkeit 2: Leitungswasser 100
 K^2HPO^4 0,05 K^2HPO^4 0,05
 Glukose 2 Glukose 2

No. des Versuches und Kulturzeit	Anzahl Kultur-tage	Kulturflüssigkeit	Infektionsmaterial	$cc_{10}^N SO^4H^2$		Differenz und Korrektur	Differenz korrigiert	Stickstoffgewinn in mg			Bemerkungen
				Vor der Destillation	Nach der Destillation			gefunden	pro Liter	pro Gramm Glukose od. Mannit	
1. bis 9. Mai	8	No.1, 300 ccm getrocknete Erde 1 g	Chroococcum roh, frische Gartenerde	20,6	3,7	16,9 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,1 Mannit 0,6 Erde 4 Filter 0,35 5,75	11,15	15,61	51,98	2,60	Propyl-alkohol gebildet
2. bis 1. Nov.	41	No.1, 300 ccm	Chroococcum roh, 2 mal übergeimpft	22,7	14,5	8,2 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,1 Mannit 0,6 Filter 0,35 1,75	6,45	9,03	30,07	1,55	
3. bis 1. Nov.	41	No.1, 300 ccm Kreide 6 g (stickstofffrei)	Chroococcum roh, 3 mal übergeimpft	22,7	16,0	6,7 Korr. wie No. 2 1,75	4,95	6,93	23,08	1,15	
4. bis 14. Nov.	5	No.1, 300 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococcum roh, 6 mal übergeimpft	20,6	11,7	8,9 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,1 Mannit 0,6 Erde 2, — Filter 0,35 3,75	5,15	7,21	24,01	1,21	Kein Gas gebildet
5. bis 14. Nov.	5	No.1, 300 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococcum roh, 6 mal übergeimpft	20,6	13,2	7,4 Korr. wie No. 4 3,75	3,65	5,11	17,01	0,85	Wenig Gas gebildet
6. bis 16. Nov.	7	No.1, 300 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococcum roh, 6 mal übergeimpft	20,6	11,3	9,3 Korr. wie No. 4 3,75	5,55	7,77	25,87	1,29	Viel Gas gebildet
7. bis 1. Dez.	8	No.1, 300 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococcum roh, 17 mal übergeimpft	30,9	11,4	19,5 Korr. wie No. 4 3,75	15,75	22,05	73,42	3,67	Viel Gas gebildet, kein Butyl-alkohol
8. bis 1. Dez.	8	No.2, 300 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococcum roh, 17 mal übergeimpft	30,9	9,8	21,1 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,1 Glukose 0,3 Erde 2 Filter 0,35 3,45	17,65	24,71	82,28	4,12	Viel Gas gebildet, kein Butyl-alkohol
9. bis 5. Dez.	12	No.1, 300 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococcum roh, 17 mal übergeimpft	30,9	17,4	13,5 Korr. wie No. 4 3,75	9,75	13,65	45,45	2,27	Viel Gas gebildet, kein Butyl-alkohol

Stickstoffgewinn in Rohkulturen.

No. des Versuches und Kulturzeit	Anzahl Kulturtage	Kulturflüssigkeit	Infektionsmaterial	$\frac{N}{10} SO_4 H_2$		Differenz und Korrektur	Differenz korrigiert	Stickstoffgewinn in mg			Bemerkungen
				Vor der Destillation	Nach der Destillation			gefunden	pro Liter	pro Gramm Glukose od. Mannit	
10. S. Nov. bis 4. Dez.	6	No.2, 150 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococcum roh. 20mal übergeimpft	30,9	12,8	18,1 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,04 Glukose 0,15 Erde 2 Filter 3,24	14,86	20,80	138,52	6,93	Viel Gas gebildet, kein Butylalkohol Glukose verschwunden
11. S. Nov. bis 4. Dez.	6	No.2, 150 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococcum roh. 20mal übergeimpft	30,9	13,1	17,8 Korr. wie No.10 3,24	14,56	20,38	135,73	6,79	Viel Gas, kein Butylalkohol-Spur, Glukose noch vorhanden
12. S. Nov. bis 10. Dez.	12	No.1, 200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococcum roh. 21mal übergeimpft	30,9	17,2	13,7 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,06 Mannit 0,4 Erde 2 Filter 0,35 3,51	10,19	14,26	71,30	3,56	Viel Gas gebildet, kein Butylalkohol
13. S. Nov. bis 6. Dez.	6	No.2, 200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococcum roh	30,9	16,0	14,9 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,06 Glukose 0,2 Erde 2 Filter 0,35 3,31	11,59	16,22	81,10	4,05	Wenig Gas gebildet, kein Butylalkohol
14. S. bis 30. Dez.	12	No.2, 200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococcum roh. aus Glukose übergeimpft	20,6	17,2	3,4 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,06 Glukose 0,2 Filter 0,35 1,31	2,09	2,92	14,60	0,73	Milchsäure gebildet durch Aërogenes
15. 7. bis 16. Jan.	9	No.2, 200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococcum roh. 1mal übergeimpft	30,8	11,4	19,4 Korr. wie No.12 3,51	15,89	22,24	111,20	5,56	Glukose verschwunden
16. 7. bis 30. Jan.	21	No.1, 200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Frische Garten-erde	20,8	14,1	6,7 Korr. wie No.12 3,51	3,19	4,46	22,30	1,12	Mannit nicht ganz verschwunden
17. 16. bis 30. Jan.	14	No.1, 200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococcum roh. 2mal übergeimpft	20,8	7,8	13,0 Korr. wie No.12 3,51	9,49	13,28	66,43	3,57	Mannit verschwunden
18. 6. Febr. bis 14. März	36	No.2, 200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococcum roh. 34mal übergeimpft in No. 1	20,8	8,6	12,2 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,06 Glukose 0,2 Filter 0,35 1,31	10,89	15,24	76,20	3,81	Glukose verschwunden
19. 10. bis 20. Mai	10	Leitungswasser 300 Rohzucker 6 $KHPO_4$ 0,15	Chroococcum — pasteurisierte Erde + Radieicola (Rotklee)	30,9	26,4	4,5 Blanco 0,7 Leitungsw. 1 Rohzucker 0 Filter 0,35 1,15	3,35	4,69	15,61	0,78	Propylalkohol gebildet

In keinem Falle haben wir stickstoffassimilierende Rohkulturen, wofür Gartenerde als Infektionsmaterial gedient hatte, bekommen, worin *Chroococcum* dauernd fehlte. Zwar war der Zeitverlauf, nach welchem die Entwicklung dieser Bakterie bemerkbar wurde, sehr verschieden, doch wurde stets beobachtet, daß, solange diese Entwicklung noch nicht begonnen hatte, auch ein kräftiges Wachstum der Begleitbakterien, wie auch Stickstoffassimilation ausblieben.

Wenn jene Art zufälligerweise im Infektionsmaterial gefehlt hatte, blieb merkliches Wachstum in der von uns vorzugsweise verwendeten Mannitnährlösung aus, doch war die Hinzufügung einer Reinkultur derselben dann zureichend, um das Wachstum der Begleitbakterien und die Stickstoffaufnahme anzuregen.

Die höchsten Stickstoffausbeuten, welche wir überhaupt erzielten, sind in solchen Rohkulturen erhalten, z. B. bei den Versuchen 8, 10 und 11 im November und Dezember 1901. Hierbei diente als Infektionsmaterial die 17. und 20. Ueberimpfung unserer in Mannitlösung fortgeführten Hauptserie. Die verwendeten Nährlösungen waren aber in diesem Falle nicht Mannit-, sondern Glukosenährlösungen. Schon nach 6 Tagen war der Zucker verschwunden und es wurde bei den Versuchen an assimiliertem Stickstoff 6,93 und 6,79 mg pro Gramm Zucker oder 138,6 und 135,8 mg pro Liter Kulturflüssigkeit festgelegt. Diese Beträge sind mehr als doppelt so groß wie die höchsten Zahlen, welche Winogradsky in seinen Buttersäuregärungen gefunden hat, welche 3 mg N pro Gramm Zucker nicht überstiegen. Ueberdies sind unsere Kulturzeiten viel kürzer. Buttersäuregärung war bei diesen Versuchen ebensowenig bemerkbar, wie Propylbutylgärung. Dennoch waren wahrscheinlich viele Bacillen auch von diesen Fermenten gegenwärtig und aktiv bei der Stickstoffbindung beteiligt. Essentiell ist deren Gegenwart jedoch nicht, weil die Kombination *Radiobacter* + *Chroococcum* für die Stickstoffbindung ausreicht und bei vielen dieser Versuche auch sicher allein vorlag. Bei diesen, wie überhaupt bei den meisten (nicht allen) produktiven Kulturen findet ziemlich starke Gasbildung statt, welche durch verschiedene Formen von *Aërogenes* verursacht wird, wovon in den betrachteten Fällen drei Formen nachgewiesen werden konnten, wovon, wie in § 1 beschrieben, zwei Säure und einer Alkali erzeugten. Die Hauptmasse des analysierten Bakterienmaterials bestand, außer aus diesen *Aërogenes*-Formen, welche in den Versuchen erst die dritte Stelle einnahmen, der Hauptsache nach aus *Chroococcum* und in zweiter Linie aus *Radiobacter*.

Die *Granulobacter*-Arten kommen bei der Analyse kaum in Betracht, obschon darauf hingewiesen sein mag, daß besonders die Stäbchen und Clostridien der Buttersäure- und Butylfermente individuell eiweißreich sind und eine viel dünnere Schleimhaut besitzen, wie die *Chroococcum*- und *Radiobacter*-Zellen. Hiermit soll natürlich nicht behauptet sein, daß diesen Formen keine Bedeutung für die Stickstoffbindung in den Rohkulturen zuzuschreiben ist; ganz im Gegenteil, es steht fest, daß selbst eine geringe Zahl von *Granulobacter*-Individuen in

dieser Beziehung sehr aktiv ist, und zwar durch Erzeugung der Stickstoffverbindung aus dem freien Stickstoff, welcher durch *Chroococcum* weiter verarbeitet wird. Doch ist das natürlich etwas ganz anderes, wie die Frage nach der Herkunft des schließlich bei der Analyse vorliegenden Bakterieneiweißes. Und es kann, wie gesagt, *Granulobacter* in den Rohkulturen auch vollständig fehlen.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist trotz der Verwendung eines scheinbar identischen Infektionsmaterials bei sicher identischen Ernährungsbedingungen das Resultat der Versuche sehr fluktuierend, was besonders hervorgeht aus dem Vergleiche der Kulturen 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 17 und 18, welche alle aus unserer Hauptserie in der, in den Versuchen bezeichneten Weise, geimpft waren. Offenbar handelt es sich dabei um schwierig berechenbare Umstände, welche einerseits aus der relativen Anzahl der zufällig ausgesäten Keime der in den verschiedenen Rein- und Rohkulturen vorkommenden Arten, andererseits aus dem eigentümlichen Accommodationszustand der letzteren erklärt werden müssen. Aus Versuch 14 bemerkt man, daß sobald *Aërogenes* sich beträchtlich vermehrt, infolge von Milchsäurebildung die Stickstoffassimilation sich stark vermindert.

Im Versuch 19 sieht man, daß die Zufügung von *Radicicola* aus Rotklee an und für sich nicht imstande war, einen günstigen Effekt zu sichern.

Uebrigens glaube ich, daß die Beschreibung der Versuche in der Tabelle übersichtlich genug ist, um eine längere Betrachtung davon hier unnötig zu machen.

3. Stickstoffgewinn in partiellen Rohkulturen.

Wir wünschen nun die Stickstoffausbeuten zu betrachten, welche wir in den als „partielle Rohkulturen“ bezeichneten Versuchen erzielten.

Diese beziehen sich auf Kulturen, wo nicht das vollständige Bakteriengemisch aus frischer Erde zur Aussaat verwendet wird, sondern nur die darin vorkommenden sporogenen Formen, so wie sie bei der Erhitzung während 5 Minuten auf 85° C lebend bleiben, wozu dann bestimmte, nicht sporenbildende Arten noch überdies zugesetzt werden können.

(Siehe Tabelle Seite 26 und 27.)

Wie man aus der Tabelle sieht, haben unsere Kulturen, in Uebereinstimmung mit Winogradsky's Angabe, zwar überzeugend gezeigt, daß die Gegenwart von nicht sporenbildenden Arten für die Stickstoffbindung nicht unbedingt notwendig ist (Vers. 20, 22, 23). Fügten wir der pasteurisierten Erde jedoch *Radio-bacter* zu, so hat sich das Resultat in gewissen Fällen in quantitativer Beziehung etwas gebessert (Vers. 28), in anderen Fällen nicht (Vers. 29). Wenn aber *Chroococcum* zugleich mit pasteurisierter Erde zur Aussaat kam, sind die Resultate entschieden günstiger ge-

Stickstoffgewinn in partiellen Rohkulturen.

Kulturflüssigkeit No. 1: Leitungswasser 100 Kulturflüssigkeit No. 2: Leitungswasser 100
 Mannit 2 Glukose 2
 K^2HPO^4 0,05 K^2HPO^4 0,05

No. des Versuches und Kulturzeit	Anzahl Kultur-tage	Kultur-flüssigkeit	Infektions-material	$\frac{cc}{10} \frac{N}{SO^4H^2}$		Differenz und Korrektur	Differenz korrigiert	Stickstoffgewinn in mg			Bemerkungen
				Vor der Destillation	Nach der Destillation			gefunden	pro Liter	pro Gramm Glukose od. Mannit	
20. 7. Dez. bis 16. Jan.	20	No.1, 200 ccm Kreide 4 g	Pasteurisierte Gartenerde	20,8	18,4	2,4 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,06 Glukose 0,2 Filter 0,35 Kreide 0 1,31	2,09	1,24	6,20	0,31	Buttersäure gebild. Noch Mannit übr.
21. 8. bis 22. April	14	No.2, 200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g, Kreide 2 g	Chroococc. + pasteurisierte Erde v. Gras- boden	20,6	3,2	17,4 Blanco 0,9 Glukose 0,2 Leitungsw. 0,06 Erde 2 Filter 0,35 3,31	14,09	19,72	98,60	4,93	Glukose ver- schwunden, kein. Butter- säure, Propyl-Butyl- alkohol
22. 8. bis 23. April	15	No.2, 200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g, Kreide 2 g	Pasteurisierte Erde v. Gras- boden	20,6	15,8	3,8 Korr. wie No.63 3,31	0,49	0,68	3,40	0,17	Glukose ver- schwunden, Buttersäure
23. 14. bis 23. April	9	No.9, 200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g, Kreide 2 g	Pasteurisiertes Material aus No. 21	20,6	12,7	7,9 Korr. wie No. 63 3,31	4,59	6,42	32,10	1,60	Glukose ver- schwunden, Buttersäure
24. 20. Sept. bis 1. Nov.	41	No.1 300 ccm	Chroococc. + Buttersäure- gärung aus 20	22,7	16,2	6,5 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,1 Mannit 0,6 Filter 0,35 1,75	4,75	6,65	22,14	1,11	
25. 20. Sept. bis 1. Nov.	41	No.1, 300 ccm Kreide 6 g	Chroococc. + Buttersäure- gärung aus 22	22,7	16,1	6,6 Korr. wie No. 2 1,75	4,85	6,79	22,61	1,13	Mannit nicht ganz ver- schwunden
26. 20. Dez. bis 10. Jan.	21	No.2, 200 ccm	Chroococc. + spontaner In- fekt. gekoch- ter Nährlös.	20,8	9,5	11,3 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,06 Glukose 0,2 Filter 0,35 1,31	9,99	13,98	69,90	3,49	Mannit ver- schwunden, kein. Butter- säure
27. 27. Dez. bis 16. Jan.	20	No.1, 200 ccm	Chroococc. + Buttersäure- gärung 25	20,8	17,9	2,9 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,06 Mannit 0,4 Filter 0,35 1,51	1,39	1,94	9,70	0,48	Mannit nicht ganz ver- schwunden, Spuren von Buttersäure

Stickstoffgewinn in partiellen Rohkulturen.

No. des Versuches und Kulturzeit	Anzahl Kultur-tage	Kultur-flüssigkeit	Infektions-material	$\text{cc} \frac{\text{N}}{10} \text{SO}^4\text{H}^2$		Differenz und Korrektur	Differenz korrigiert	Stickstoffgewinn in mg			Bemerkungen
				Vor der Destillation	Nach der Destillation			gefunden	pro Liter	pro Gramm Glukose od. Mannit	
28. 17. Jan. bis 7. Febr.	21	No.2, 200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g, Kreide 0,5 g	Radiobacter + pasteurisierte Erde	20,8	12,2	8,6 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,06 Glukose 0,2 Erde 2 Filter 0,35 3,31	5,29	7,40	37,03	1,85	Glukose verschwunden
29. 17. Jan. bis 7. Febr.	21	No.1, 200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Radiobacter + pasteurisierte Erde	20,8	15,8	5,0 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,06 Mannit 0,4 Erde 2 Filter 0,35 3,51	1,49	2,08	10,40	0,52	Mannit nicht ganz verschwunden
30. 27. Jan. bis 14. März	46	No.1, 200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococc. + Radiobacter + pasteuris. Erde	20,8	6,9	13,9 Korr. wie No. 29	10,39	14,54	72,70	3,63	Mannit nicht ganz verschwunden, Buttersäure gebildet

worden (Vers. 21, 25, 26, 30) und vergleichbar mit den besseren Rohkulturen, wenn wir auch niemals die besten Resultate, welche mit den letzteren erzielt sind, in dieser Versuchsreihe realisieren konnten.

Glukose bei Gegenwart von Kreide und bei Infektion mit pasteurisierter Erde geht sehr leicht in Buttersäuregärung über, was in unserer Nährlösung 2 mit Stickstoffbindung vereinigt ist. Warum die dabei von uns erzielten Zahlen (Vers. 20, 22, 23) so niedrig geblieben sind, ist nicht recht deutlich. Veränderung in der Lüftung oder Verwendung von Rohrzucker, Lävulose oder Mannit brachte darin keine Veränderung. Die Stickstoffausbeute erhöhte sich zwar auch bei eingetretener Buttersäuregärung, wenn Radiobacter zugesetzt wurde, ohne jedoch zu dem von uns erwarteten Maximum anzusteigen.

Die große Bedeutung von *Chroococcum* auch für diese Serie ergibt sich z. B. aus dem Vergleich der Versuche 21 und 22, wovon der erstere, wo jene Art mit pasteurisierter Erde zusammen geimpft war, 4,93 mg gebundenen Stickstoff pro Gramm Zucker geliefert hat, während die daraus durch Pasteurisieren erhaltenen Sporen, also ohne *Chroococcum*, nur 1,6 mg. produzierten. Versuch 22 zeigt überdies, daß hier nicht an verminderte Accommodation der Fermente gedacht werden kann, denn die pasteurisierte Erde, für sich gebraucht, ohne Passage einer Symbiose mit *Chroo-*

coccum, lieferte nur 0,17 mg in ebensoviel Kulturtagen wie bei Versuch 21. Die günstigen Resultate, welche bei diesen partiellen Rohkulturen mit Glukose zu erzielen sind, im Gegensatz zu den vollständigen Rohkulturen der vorhergehenden Serie, müssen daraus erklärt werden, daß viele Bakterien aus nicht pasteurisierter Erde aus Glukose Säure erzeugen, was namentlich gilt von allen Fluorescenten, sowohl den verflüssigenden wie den nichtverflüssigenden, während in den partiellen Rohkulturen die für die Stickstoffbindung so schädliche Säurebildung hauptsächlich nur seitens des Buttersäurefermentes zu fürchten ist, während die übrigen sporenbildenden Arten nur schwache Säurebildner sind. Daß selbst sehr fein verteilte Kreide ziemlich schwierig in den Nährlösungen die Säuren neutralisiert, ist bekannt, und die günstige Wirkung von *Chroococcum* muß zweifellos zum Teil aus dessen stark oxydierender Wirkung auf die organischen Säuren und anderenteils aus dessen unter allen Umständen stattfindender Alkalibildung erklärt werden.

Bei zahlreichen Versuchen mit allerlei anderen Bakterienarten ist es uns nicht gelungen, ebensowenig in den Mannit- wie in den Glukosenährlösungen, die günstige Wirkung von *Chroococcum* (und *Radiobacter*) zu ersetzen. Wir wählten dazu *Aërogenes*, *Coli*, die Fluorescenten, *Prodigiosus* und *Radicicola*, entweder jede für sich oder auf allerlei Weise miteinander und der pasteurisierten Erde kombiniert, alles aber vergebens. Dennoch glauben wir, auf Grund der Verwandtschaft mit *Radiobacter*, daß besonders *Radicicola* dazu wohl instande sein könnte, wenn nicht durch die Laboratoriumskultur in einen abnormen Zustand gekommen.

Zu den bemerkenswerten Versuchen von dieser Serie gehört 26, wo die einzigen Begleitbakterien von *Chroococcum* nur solche Arten waren, welche in dem Leitungswasser lebendig geblieben waren, nachdem dasselbe gekocht war. Solche Kulturen sind uns mehrfach vorgekommen. Mikroskopisch findet man darin, neben sehr viel *Chroococcum*, nur Stäbchen, welche leicht in aërobe Kultur gebracht werden können auf Glukoseagarplatten bei 28° C. Die dabei erhaltenen Kolonien gehören meistens zu *Granulobacter polymyxa*, auch bemerkt man darunter den gewöhnlichen Kartoffelpilz, *Mesentericus vulgaris*, sowie Uebergänge zwischen diesen beiden Arten. Auch ließen sich in einem Falle *Sphaericum*-Kolonien darunter nachweisen. Die damit erhaltene Stickstoffausbeute von 3,49 mg ist eine gute zu nennen. Schon nach der ersten Ueberimpfung solcher Rohkulturen in der gleichen Nährlösung verminderte sich die Stickstoffausbeute und wurde bei der wiederholten Ueberimpfung gleich denjenigen, welche in den Kombinationskulturen von *Chroococcum* + *Polymyxa* oder *Ch.* + *Sphaericum* (Vers. 51 und 52) zu erreichen sind. Die Erklärung dieses allmählichen Verlustes des Vermögens der Stickstoffassimilation geht, hier, wie immer, parallel mit dem Verluste der Mikroaërophilie bei diesen Arten, womit jene Funktion sozusagen umgekehrt proportional ist.

Im übrigen sei für weitere Details wieder auf die Beschreibung der Versuche in der Tabelle verwiesen.

4. Stickstoffgewinn bei Wechselkultur.

Eine besondere Rubrik unserer partiellen Rohkulturen mag den Namen von „Wechselkulturen“ erhalten. Wir verstehen darunter Ueberimpfungen in Nährlösungen, worin infolge der darin gebotenen Nahrung eine andere Mikrobenkombination entsteht, wie anfangs hineingebracht war, und Zurückimpfung aus diesem Medium in das ursprüngliche. In unserem speziellen Falle war es uns darum zu thun, aus den Rohkulturen vielleicht unbekannte Anaëroben zu entfernen. Zwar hatten wir diesen Zweck schon dadurch zu erreichen gesucht, daß wir aus Impfstrichen von Rohkulturen auf Glukoseagarplatten Stücke mit Kolonieengemischen ausgeschnitten hatten, welche unserem Zwecke zu entsprechen schienen, doch waren wir dabei nicht zu einem vollständig überzeugenden Resultate gekommen. Es hatte sich nämlich herausgestellt, daß die direkte Ueberimpfung einer Rohkultur stets ein viel besseres Resultat giebt wie Infektion der Nährlösung mit Stücken aus der Agarplatte, selbst dann, wenn dafür der ganze Strich, also Kolonien + Zwischenräume, verwendet wurde. Zunächst glaubten wir annehmen zu müssen, daß wir auf diese Weise wirklich eine für die intensive Stickstoffbindung notwendige Anaërobe durch den Kontakt mit der Luft abgetötet hatten. Später kamen wir jedoch zu der Ansicht, daß es sich hierbei nicht um die Beseitigung von Anaëroben, sondern um die Verminderung der Mikroaërophilie bei den stickstoffbindenden Formen überhaupt handeln mußte. Durch das Studium sowohl von *Gr. sphaericum* wie von *Gr. reptans* war nämlich, wie schon hervorgehoben, sicher gestellt, daß wenigstens bei diesen Arten die stickstoffbindende Aktivität vermindert bei aërober Kultur, und wir erwarteten das Gleiche für die nicht sporenbildenden Symbionten, das heißt besonders für *Radiobacter* und *Aërogenes*.

Wir suchten darum die erwünschte Beseitigung aller *Granulobacter*-Formen, sowohl der anaëroben wie der aëroben, ohne den Gebrauch eines festen Nährbodens zu erreichen, und zwar durch Ueberimpfung einer Mannit-Rohkultur in eine Lösung, worin zwar energisches Wachstum von *Chroococcum* stattfinden kann, so daß der Sauerstoff größtenteils verschwindet, jedoch kein Zucker vorkommt, was eben das Wachstum von *Granulobacter* ausschließt. Organische Salze sind für die Erreichung dieses Zweckes die geeignetste Kohlenstoffquelle. Zwar findet darin überhaupt keine Stickstoffbindung statt, doch lehrt die Erfahrung, daß diese Funktion zeitweise außer Arbeit gestellt werden kann, ohne dann in die Ueberimpfungen für immer verschwunden zu sein. Wir verwendeten z. B. die folgende Nährlösung:

Leitungswasser	100
Natriumacetat	0,5
K ² HPO ⁴	0,05
Frische Erde	2

Die Erde dient als Stickstoffquelle, welche in diesem Falle notwendig ist, weil, wie gesagt, in Natriumacetatlösung keine Stickstoffassimilation stattfindet. Es wird bei 25° kultiviert und die sich entwickelnde, vorwiegend aus *Chroococcum* bestehende Bakterienhaut wird übergeimpft in eine ähnliche, jedoch vorher sterilisierte Nährlösung. Die Ueberimpfung wird wiederholt, und wenn die entsprechende Verdrängung der im Acetat nicht lebens- oder konkurrenzfähigen Granulobakterien stattgefunden hat, findet Zurückimpfung in die Zuckerlösung statt.

Hier folgt die Uebersicht eines solchen Versuches:

Versuchszeit	Kulturflüssigkeit	$\text{ccm } \frac{N}{10} \text{SO}^4\text{H}^2$		Differenz und Korrektur	Differenz korrigiert	Stickstoffgewinn in Milligramm		
		vor der Destill.	nach der Destill.			total gefunden	pro Liter	pro Gramm Mannit
11. Febr. bis 14. März = 31 Kultur-tage	Leitungsw. 200 Mannit 4 K'HPO ⁴ 0,1 Erde (steril) 0,5	20,8	5,4	15,4 Blanco 0,7 Filter 0,35 Mannit 0,4 Erde 2 3,5	11,9	16,6	83,0	4,16

Das Mannit war gänzlich verschwunden, ohne daß Gärungserscheinungen bemerkbar gewesen waren, und bei der mikroskopischen und bakteriologischen Prüfung wurden nur sporenfreie Formen gefunden, welche sich als *Aërogenes* in Minderzahl und mehrere Varietäten von *Radiobacter* herausstellten, *Granulobacter* war sicher nicht gegenwärtig. Trotzdem ist der Gehalt an gebundenem Stickstoff beträchtlich. Wir glauben deshalb berechtigt zu sein, zu schließen, daß das Verfahren ein Mittel giebt, nicht nur gewisse Bakteriengruppen mit bestimmten physiologischen Eigenschaften zu beseitigen, sondern auch, um die stickstoffassimilierenden Arten, wenigstens während der für die Reinigung notwendigen Reihe von Ueberimpfungen gänzlich unverändert zu erhalten.

5. Stickstoffgewinn in Reinkulturen und Kombinationskulturen bekannter *aërober* Bakterienarten.

In dieser Reihe sollen die Versuche vereinigt werden, welche sich auf Kombinationen von reinkultivierten Arten und auf diese letzteren allein beziehen.

Zunächst wurde festgestellt, daß *Chroococcum* an und für sich in unseren Nährlösungen keinen (wie in den Vers. 31a und 31b) oder (wie in 31c) doch nur so wenig Stickstoff zu binden vermag, daß darauf keine bestimmte Meinung gegründet werden kann. Als sich dann weiter herausstellte, daß eben diese nämlichen Kulturen durch Zutritt von Sporen von *Granulobacter*, sei es aus der Luft oder durch unvollständige Sterilisation der Kulturflüssigkeiten, zu einer kräftigen Stickstoffbindung veranlassen, und daß relativ wenige,

schwierig nachweisbare *Granulobacter*-Stäbchen in dieser Beziehung einen sehr bedeutenden Effekt haben können, glaubten wir lange, annehmen zu müssen, daß in denjenigen Kombinationskulturen von *Chroococcum* mit anderen nicht sporenerzeugenden Arten, welche sich als Stickstoff sammelnd herausstellten, wohl ebenfalls an unbemerkt hineingelangte *Granulobacter*-Keime gedacht werden sollte.

Mit der Häufung unserer Erfahrung fanden wir aber, daß dieser Standpunkt ein zu enger war, und daß es sicher aërobe sporenfreie, von *Granulobacter* gänzlich verschiedene Bakterien giebt, welche zusammen mit *Chroococcum* den freien Stickstoff binden können. Diese Arten, wovon wir *Radiobacter* und *Aërogenes* in § 1 näher kennen lernten und auch bei der Besprechung unserer Wechselkulturen schon angeführt haben, sind in ihren Ernährungsbedingungen weniger spezialisiert wie *Granulobacter*, und können sich z. B., im Gegensatz zu dieser Gattung, sehr gut mit Salzen organischer Säuren, besonders Malaten, Citraten und Succinaten ernähren, doch findet nur dann Stickstoffbindung durch dieselben statt, wenn irgend eine Zuckerart als Kohlenstoffquelle geboten wird. Letzterer Umstand dürfte darauf beruhen, daß auch bei diesen Arten nur bei Gegenwart von Zucker Mikroaërophilie möglich ist, welche immer als Grundlage für die Assimilation des freien Stickstoffs notwendig zu sein scheint.

Von den hier zunächst in Betracht kommenden Reinkulturen, wovon die auf *Chroococcum* sich beziehenden (31a, 31b, 31c) schon genügend besprochen sind, sind nur einzelne (Vers. 32 bis 35) in die Tabelle aufgenommen, weil von den zahlreichen in dieser Beziehung ausgeführten Versuchen die meisten schon auf den ersten Anblick die Ueberzeugung gaben, daß darin keine Stickstoffbindung hatte stattfinden können, weil kein Wachstum bemerkbar war; dieselben wurden deshalb nicht analysiert. Es kann aber auch vorkommen, daß eine so starke Schleimbildung ohne merkliche Stickstoffbindung vorkommt, daß man sich in Bezug auf letzteren Vorgang täuscht, und eine Analyse notwendig erscheint, während umgekehrt in Kombinationskulturen mit scheinbar schwachem Wachstum dennoch unter Umständen Stickstoffaufnahme stattfinden kann. Darum bestand Veranlassung, auch die Reinkulturen von *Aërogenes*, *Coli*, *Mucosum*, *Radiobacter*, *Reptans*, *Sphaericum* und *Tenax* zu untersuchen, jedoch mit negativem Erfolg, warum die betreffenden Versuche nicht aufgenommen sind. Für *Polymyxa* konnte erwiesen werden, daß diese Art, unter noch nicht gut festgestellten Bedingungen ganz allein ohne gebundenen Stickstoff wachsen kann. Der Versuch, woraus dieses hervorging, war mit einer Glukosenährlösung angestellt, ist aber zufällig verloren gegangen. Die Wiederholung ist nicht gelungen. Uebrigens ist genügend Ursache da, um anzunehmen, daß auch *Reptans*, *Mucosum*, *Tenax* und *Sphaericum* unter geeigneten Bedingungen ganz allein den atmosphärischen Stickstoff binden können.

Eigentümlicherweise haben wir in einem bestimmten Falle

(Vers. 33) mit dem Kartoffelpilz (*B. mesentericus vulgatus*) ein positives Resultat in einer Reinkultur erhalten, doch war das spezifische Vermögen schon bei der ersten Ueberimpfung verloren und konnte bei anderen Isolierungen nicht zurückgefunden werden¹⁾. Nichtsdestoweniger ist es wahrscheinlich, daß eben diese Art für die Stickstoffsammlung in der Natur einige Bedeutung besitzt.

Zu den Kombinationskulturen übergehend, muß zunächst bemerkt werden, daß dieselben bei Abwesenheit von *Chroococcum* entweder ein durchaus negatives oder ein zweifelhaftes Resultat ergeben haben. Dazu gehören z. B. die Versuche mit *Mesentericus vulgatus* + *Radiobacter* (Vers. 34), *Sphaericum* + *Radiobacter*, *Sphaericum* + *Radiciicola*, *Reptans* + *Radiobacter*, *Reptans* + *Radiciicola*, *Mesentericus* + *Radiciicola*, *Mesentericus* + *Fluorescens* und *Subtilis* in verschiedenen Kombinationen.

Da wir aber Grund haben, für alle *Granulobacter*-Formen anzunehmen, daß sie unter bestimmten Bedingungen selbst in den Reinkulturen freien Stickstoff assimilieren können, können wir doch diese Versuche mit negativem Resultat noch nicht als beweisend betrachten, schließen daraus vielmehr auf einen ungenügenden Accommodationszustand jener Formen.

Wir kommen nun zur Besprechung derjenigen Kombinationen, worin *Chroococcum* vorkommt, und finden hier, wie in den Rohkulturen oft sehr beträchtliche Stickstoffanhäufung. Zunächst sind diejenigen Kombinationen, worin *Reptans* oder *Sphaericum* vorkommen, bemerkenswert. Hierbei kommen nämlich die folgenden Tatsachen zur Beobachtung: Es kann vorkommen, und dieses gilt eben für die am meisten produktiven Kulturen, wie z. B. für Versuch 50, daß *Chroococcum* in dem zur Analyse kommenden Material eine ganz untergeordnete Rolle spielt und dieses beinahe gänzlich aus den Stäbchen, Clostridien und Sporen von *Sphaericum* oder *Reptans* selbst besteht. Solche Bilder geben die Ueberzeugung, daß diese letzteren Bakterien wohl unter geeigneten Bedingungen auch ganz allein, also ohne Gegenwart von *Chroococcum*, wachsen und Stickstoff würden binden können, worauf schon oben, bei Besprechung der Reinkulturen, hingedeutet wurde.

Welcher spezifische Umstand dazu aber gefordert wird, ist noch nicht klar. Für das Gelingen eines solchen Versuches müssen die genannten Arten jedoch sicher in einem bestimmten Accommodationszustand vorkommen, der mit dem Maße ihrer Mikroaërophilie zusammenhängt. Uebrigens ist bemerkenswert, daß alle Kombinationskulturen von *Chroococcum* mit *Granulobacter*-Formen, und unabhängig von den übrigen Begleitbakterien, zu Assimilation von mehr

1) Die verwendete Form war aus Gartenerde isoliert durch folgenden Versuch: Werden Scheiben von lebenden Kartoffeln mit Gartenerde infiziert, so wächst darauf, bei Luftzutritt und bei Temperatur unterhalb 25° C, gar nichts. Dagegen entwickeln sich auf dem lebenden Gewebe bei 37° C 3 Arten, nämlich: ausnahmslos *B. mesentericus* und *B. subtilis* und selten *Granulobacter polymyxa*. Zu gleicher Zeit ist durch dieses Verhalten ein gutes Mittel zur Diagnose dieser Formengruppe gegeben. Bei Luftabschluß ist auch bei Temperaturen unterhalb 25° C auf lebenden Kartoffeln Wachstum von 2 Anaëroben möglich, welche die sogenannte „Naßfäule“ bewirken.

oder weniger freiem Stickstoff Veranlassung gegeben haben, so daß die hohe Bedeutung eben dieser Kombinationen für den Vorgang überhaupt unzweifelhaft feststeht.

Stickstoffgewinn in Reinkulturen und Kombinationskulturen von bekannten Arten.

Kulturflüssigkeit No. 1: Leitungswasser 100,— K₂HPO₄ 0,05 Mannit 2,— Kulturflüssigkeit No. 2: Leitungswasser 100,— K₂HPO₄ 0,05 Mannit 2,—

No. des Versuches und Kulturzeit	Anzahl Kultur-tage	Kultur-flüssigkeit	Infektions-material	$\frac{N}{10}SO^4H^2$		Differenz und Korrektur	Differenz korrigiert	Stickstoffgewinn in mg			Bemerkungen
				Vor der Destillation	Nach der Destillation			gefunden	pro Liter	pro Gramm Glukose od. Mannit	
31a. 7. Jan. bis Febr.	21	No.1, 100 ccm	Chroococcum	20,8	19,2	1,6 Blanco Leitungsw. 0,06 Mannit 0,4 Filter 0,35 1,51	0,09	0	0	0	Noch viel Mannit übrig
31b. 9. Dez. bis 4. März	84	No.1, 200 ccm	Chroococcum	20,8	19,4	1,4 Korr. wie No.27 1,51	0	0	0	0	Noch viel Mannit übrig
31c. 9. Dez. bis 6. Jan.	27	No.1, 200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococcum	20,8	16,9	3,9 Blanco Leitungsw. 0,06 Mannit 0,4 Erde 2 Filter 0,35 3,51	0,39	0,54	2,70	0,13	Mannit nicht ganz verschwunden
31d. 1. bis 18. Dez.	6	No.2, 200 ccm	Chroococcum	20,6	18,5	2,1 Blanco Leitungsw. 0,06 Glukose 0,2 Filter 0,35 1,31	0,79	1,10	5,50	0,27	Nur Chroococcum
32. 6. Dez. bis 10. Jan.	15	No.2, 200 ccm aber 1 Proz. Glukose	Mesentericus vulgatus	20,8	19,5	1,3 Blanco Leitungsw. 0,06 Glukose 0,1 Filter 0,35 1,21	0,09	0	0	0	Glukose nicht ganz verschwunden
33. 3. Dez. bis 10. Jan.	15	No.2, 200 ccm	Mesentericus vulgatus, von lebenden Kartoffeln isoliert	20,8	17,6	3,2 Blanco Leitungsw. 0,06 Glukose 0,2 Filter 0,35 1,31	1,89	2,64	13,20	0,66	Glukose nicht ganz verschwunden
34. 4. Jan. bis 1. Febr.	22	No.2, 200 ccm	Mesentericus vulgatus + Radiobacter	20,8	19,5	1,3 Korr. wie No.32 1,31	0	0	0	0	Noch viel Glukose, stark schleimig, etwas Säure gebildet
35. 1. Jan. bis	41	No.2, 200 ccm	Mesentericus vulgatus + Radiobacter	20,8	19,3	1,5 Korr. wie No.32 1,31	0,19	0,26	1,30	0,06	Noch viel Glukose übrig

Stickstoffgewinn in Kombinationskulturen von bekannten Arten.

No. des Versuches und Kulturzeit	Anzahl Kultur-tage	Kultur-flüssigkeit	Infektions-material	$\frac{CO_2}{10} SO_4 H^2$		Differenz- und Korrektur	Differenz korrigiert	Stickstoffgewinn in mg			Bemerkungen
				Vor der Destillation	Nach der Destillation			gefunden	pro Liter	pro Gramm Glukose od. Mannit	
36. 17. Dez. bis 10. Jan.	23	No.1, 200 ccm	Chroococcum + Aërogenes 1	20,8	17,6	3,2 Korr. wie No.27 1,51	1,69	2,36	11,83	0,59	Mannit noch nicht ganz verschwunden
37. 18. Dez. bis 10. Jan.	22	No.1, 200 ccm	Chroococcum + Aërogenes 2	20,8	17,2	3,6 Korr. wie No.27 1,51	2,09	2,92	14,60	0,73	Mannit nicht ganz verschwunden
38. 18. Dez. bis 10. Jan.	22	No.1, 200 ccm aber 1 Proz. Mannit	Chroococcum + Aërogenes 2	20,8	18,3	2,5 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,06 Mannit 0,2 Filter 0,35 <u>1,31</u>	1,19	1,66	8,30	0,83	Mannit nicht ganz verschwunden
39. 27. März bis 18. April	21	No.1, 200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococcum + Radiobacter	20,6	12,1	3,5 Blanco 0,7 Mannit 0,4 Leitungsw. 0,06 Erde 2 Filter 0,35 <u>3,51</u>	4,99	6,98	34,90	1,74	Mannit nicht völlig verschwunden
40. 24. Jan. bis 6. Febr.	12	Leitungs- wasser 200 K ² HPO ₄ 0,100 Rohr- zucker 4,—	Chroococcum + Radiobacter	20,8	19,6	1,2 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,06 Rohrzuck. 0,0 Filter 0,35 <u>1,11</u>	0,09	0	0	0	Noch viel Rohrzucker übrig
41. 6. Febr. bis 14. März	36	No.2, 200 ccm	Chroococcum + Radiobacter	20,8	18,3	2,5 Korr. wie No.32 1,31	1,19	1,66	8,30	0,41	Glukose nicht ganz verschwunden. Sehr viel Schleim gebildet
42. 6. Febr. bis 14. März	36	No.2, 200 ccm Sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococcum + Radiobacter	20,8	6,5	14,3 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,06 Glukose 0,2 Erde 2 Filter 0,35 <u>3,31</u>	10,99	15,38	76,90	3,84	Glukose nicht ganz verschwunden. Nicht schleimig
43. 11. Febr. bis 14. März	31	No.1, 200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococc. + Radiobacter	20,8	5,9	14,9 Korr. wie No.29 3,51	11,39	15,94	79,70	3,98	Mannit nicht ganz verschwunden

Stickstoffgewinn in Kombinationskulturen von bekannten Arten.

No. des Versuches und Kulturzeit	Anzahl Kultur-tage	Kultur-flüssigkeit	Infektions-material	cc $\frac{N}{10}$ SO ⁴ H ²		Differenz und Korrektur	Differenz korrigiert	Stickstoffgewinn in mg			Be-merkungen
				Vor der Destillation	Nach der Destillation			gefunden	pro Liter	pro Gramm Glukose od. Mannit	
44. Febr. bis 1. März	31	No.2,200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococc. + Radiobacter	20,8	6,1	14,7 Korr. wie No.42 3,31	11,39	15,94	79,70	3,98	Glukose nicht ganz verschwunden
45. 7. Dez. bis 6. Jan.	24	No.2,200 ccm	Chroococc. + Polymyxa	20,8	18,7	2,1 Korr. wie No.32 1,31	0,79	1,10	5,50	0,27	Glukose nicht ganz verschwunden
46. 1. Jan. bis 4. März	62	No.2,200 ccm	Chroococc. + Mesenteric. vulg.	20,8	18,5	2,3 Korr. wie No.32 1,31	0,99	1,38	6,90	0,34	Noch viel Glukose, wenig Wachstum
47. 7. bis 8. Dez.	11	No.1,300 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococc. + Mucosum	20,6	9,9	10,7 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,1 Mannit 0,6 Erde 2 Filter 0,35 3,75	6,95	9,73	32,41	1,62	Chroococcum und viel Sporen von Granulobacter
48. 7. bis 8. Dez.	11	No.1,300 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococc. + Tenax.	20,6	10,4	10,2 Korr. wie No.47 3,75	6,45	9,03	30,06	1,50	Chroococcum und viel Sporen von Granulobacter
49. 1. April bis 3. Mai	12	No.2,200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococc. + Reptans (frisch isoliert)	20,6	2,4	18,2 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,06 Glukose 0,2 Filter 0,35 Erde 2 3,31	14,89	20,34	104,2	5,91	Chroococcum und viel Sporen von Granulobacter
50. 0. Nov. bis 1. Dez.	21	No.1,200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococc. + Sphaericum (frische Isolierung) Kreide 1 g	20,6	5,4	15,2 Korr. wie No.29 3,51	11,69	16,36	81,80	4,09	Wenig Chroococcum und viel Sporen von Granulobacter, Mannit verschwunden
51. 8. Dez. bis 6. Jan.	29	No.1,200 ccm aber 1 Proz. Mannit	Chroococc. + Sphaericum (alte Isolierung)	20,8	18,5	5,1 Korr. wie No.38 1,31	0,99	1,38	6,90	0,69	Mannit nicht ganz verschwunden
52. 8. Dez. bis 0. Jan.	23	No.1,200 ccm	Chroococc. + Sphaericum (mittelalte Isolierung)	20,8	15,7	5,1 Korr. wie No.27 1,51	3,59	5,02	25,10	1,25	Mannit nicht ganz verschwunden

Stickstoffgewinn in Kombinationskulturen von bekannten Arten.

No. des Versuches und Kulturzeit	Anzahl Kultur-tage	Kultur-flüssigkeit	Infektions-Material	cc $\frac{N}{10}$ SO ⁴ H ²		Differenz und Korrektur	Differenz korrigiert	Stickstoffgewinn in mg			Bemerkungen
				Vor der Destillation	Nach der Destillation			gefunden	pro Liter	pro Gramm Glukose od. Mannit	
53. 29. Dez. bis 10. Jan.	12	No.2, 200 ccm	Chroococc. + Reptans + Radiobacter	20,8	15,8	5,0 Korr. wie No.32 1,31	3,69	5,16	25,80	1,29	Glukose nicht ganz verschwunden
54. 2. bis 10. Jan.	8	No.2, 200 ccm sterilisierte Erde 1 g	Chroococc. + Reptans + Radiobacter	20,8	10,2	10,6 Blanco 0,7 Leitungsw. 0,06 Glukose 0,2 Erde 4,— Filter 0,35 5,31	5,29	7,40	37,00	1,85	Glukose nicht ganz verschwunden
55. 17. Dez. bis 16. Jan.	30	No.1, 200 ccm	Chroococc. + Aërogenes 2 + Polymyxa	20,8	19,0	1,8 Korr. wie No.27 1,51	0,29	0,40	2,00	0,10	Mannit nicht ganz verschwunden
56. 12. Dez. bis 5. Febr.	54	No.2, 200 ccm	Chroococc. + Aërogenes + Sphaerium	20,8	15,9	4,9 Korr. wie No.32 1,51	3,59	5,02	25,10	1,25	Noch viel Glukose übrig.
57. 18. Dez. bis 10. Jan.	22	No.1, 200 ccm	Chroococc. + Aërogenes 2 + Sphaerium	20,8	17,5	3,3 Korr. wie No.27 1,51	1,79	2,50	12,50	0,62	Mannit nicht ganz verschwunden
58. 18. Dez. bis 10. Jan.	22	No.1, 200 ccm	Chroococc. + Aërogenes 2 + Sphaerium	20,8	17,2	3,6 Korr. wie No.27 1,51	2,09	2,92	14,60	0,73	Mannit nicht ganz verschwunden
59. 14. Jan. bis 5. Febr.	22	No.2, 200 ccm	Chroococc. + Mesenteric. vulg. + Radiobacter	20,8	18,6	2,2 Korr. wie No.32 1,31	0,89	1,24	6,20	0,31	Glukose nicht ganz verschwunden — stark schleimig
60. 17. Jan. bis 7. Febr.	21	No.1, 200 ccm sterilisierte Erde 0,5 g	Chroococc. + Aërogenes + Radiobacter	20,8	16,1	4,7 Korr. wie No.29 3,51	1,19	1,66	8,30	0,41	Noch viel Mannit übrig
61. 6. Febr. bis 14. März	36	No.2, 200 ccm	Chroococc. + Mesenteric. vulg. + Radiobacter	20,8	17,6	3,2 Korr. wie No.32 1,31	1,89	2,64	13,20	0,66	Glukose nicht ganz verschwunden sehr viel Schleim gebildet.

Wir haben des weiteren die Überzeugung gewonnen, daß auch durch die Kombination *Chroococcum* + *Aërogenes* (Vers. 36 und 37) eine geringe, aber nicht zweifelhafte Stickstoffassimilation zustande kommen kann.

Für die sehr bemerkenswerten, wenn auch nicht völlig deutlichen Resultate, welche wir mit der Kombination *Chroococcum* + *Radiobacter* erhielten, empfehlen wir die Durchsicht unserer Versuche 39—44. Uebrigens zeigt die Studie unserer Tabelle im Ganzen, daß das Assimilationsvermögen in den Kombinationskulturen einen noch viel veränderlicheren Charakter bietet wie in den Rohkulturen, was seine Erklärung findet in dem Zusammenhang jener Funktion mit der Mikroaërophilie, womit sie steigt und fällt, derweise, daß der „anaërobe“ Zustand der Begleitbakterien die höchsten Stickstoffausbeuten zu geben imstande wäre. Wir konnten nämlich erweisen, wie schon mehrfach erwähnt, daß bei der aëroben Kultur, besonders bei den *Granulobacter*-Arten auf den Platten das Sauerstoffbedürfnis zunimmt, das heißt die Mikroaërophilie sich vermindert, womit dann gleichzeitig das Vermögen zur Stickstoffbindung fallen muß. Die Plattenkultur, welche allen diesen Versuchen zu Grunde liegt, ist deshalb verderblich für die Stickstoffassimilation in quantitativer Beziehung, was man am besten sieht aus dem Vergleich des produktiven Versuches 50 mit dem sehr wenig produktiven 51, woraus hervorgeht, wie sehr die Aktivität von *Sphaericum* sich vermindert durch die Kultur an der Luft. Etwas Aehnliches läßt sich in Bezug auf *Reptans* konstatieren aus den Versuchen 53 und 54 einerseits und Versuch 49 andererseits.

Wir kommen nun schließlich zur Besprechung derjenigen Gruppen unserer Kombinationskulturen, worin außer *Chroococcum* noch zwei andere Arten verwendet wurden. Man wird aus dem Vergleich dieser Versuche (53—61) sofort sehen, daß wir dadurch nicht viel Besonderes erreicht haben. Trotzdem sind wir so oft eben auf jene Versuchsanstellung zurückgekommen, erstens, weil wir in dieser Richtung eine Kombination zu finden hofften, wodurch es möglich sein sollte, ebenso viel Stickstoff zu binden, wie in den Rohkulturen, und andererseits, weil wir oft in diesen komplizierten Gemischen eine solche gewaltige Schleimbildung erreichten, daß wir uns auf eine hohe Eiweißausbeute fassen zu müssen glaubten, bis uns dann die Analysen lehrten, daß wir uns jedesmal getäuscht hatten. Wenn auch bei manchen dieser Versuche die Kulturzeiten zu kurz gewesen sein dürften, um die Maximumstickstoffausbeute zu erhalten, können wir doch den geringen Stickstoffgewinn nicht gut erklären und denken auch hier an ungenügende Accommodation der Versuchsbakterien an die gebotenen Ernährungsbedingungen.

Wir glauben auch in diesem Falle, daß die Durchsicht der genau beschriebenen Versuche selbst uns der weiteren Besprechung davon überheben wird.

6. Versuche über die Nitrifikation des freien Stickstoffs.

Die Lösung: Leitungswasser 100, Glukose 1, K^2HPO^4 0,05 wurde am 23. Dez. 1901 mit der 26. Ueberimpfung unserer Mannitrohrkultur geimpft. Aus dem Vergleich mit Parallelkulturen ergab sich, daß darin am 23. Jan. 1902 ca. 70 mg freier Stickstoff pro Liter gebunden war, wobei sich ein dicker *Chroococcum*-Schleim gebildet hatte mit sehr schwach alkalischer Reaktion. Der gebundene Stickstoff muß der Hauptsache nach als *Chroococcum*-Protoplasma gegenwärtig gewesen sein. Am 23. Januar wurde ein wenig frische Gartenerde eingepflanzt, erstens um solche Bakterien einzuführen, welche das Bakterieneiweiß von *Chroococcum* zu Ammonsalz abbauen konnten, und zweitens um die Fermente der Nitrifikation neu einzuführen. Nach 3 Wochen konnte eine deutliche Nitritbildung beobachtet werden und Mitte März 1902 war kein Nitrit mehr nachzuweisen, sondern nur Nitrat und dieses in reichlicher Menge. Auf kolorimetrischem Wege wurde, vermittelt der Diphenylamin-Schwefelsäure-Reaktion gefunden, daß im Filtrat der Flüssigkeit im ganzen ca. 250 mg pro Liter Nitrat (als KNO^3 berechnet) zugegen war. Weil die 70 mg N 500 mg KNO^3 entsprechen, war also ungefähr die Hälfte des assimilierten freien Stickstoffs in ca. 7 Wochen nitrifiziert. Weil dieser Stickstoff jedoch vollständig gegenwärtig gewesen sein muß in dem Körpereweiß der neugebildeten Bakterienmasse, speziell von *Chroococcum*, ist hierdurch zugleich ein ungefähres Maß gegeben für die Schnelligkeit, womit eben der im *Chroococcum*-Leibe als Eiweiß vorkommende Stickstoff nitrifizieren kann.

Wir haben diese Versuche mehrere Male wiederholt und stets mit dem gleichen Erfolge.

Bei der Ausführung davon ist es ratsam, sich nicht allein zu verlassen auf die qualitative Reaktion mit Diphenylaminschwefelsäure, sondern, wie angegeben, quantitativ vorzugehen, und zwar aus folgendem Grunde:

Wenn man frische Erde ohne weitere Zufügung in Leitungswasser bringt, so gelingt anfangs die Diphenylamin-Schwefelsäure-Reaktion nicht, selbst nicht, wenn 5–10 g Erde mit 50 ccm Wasser vermischt werden. Doch sitzen in der Erde Stoffe, welche geeignet sind, durch die Verdünnung mit Wasser und durch Lüftung ohne jede weitere Zufügung von Salzen oder anderen Körpern zu nitrifizieren. Nach einigen Tagen wird dadurch die Diphenylaminreaktion angezeigt.

Die Grenze der Empfindlichkeit wurde aber bei 0,5 g Erde in 50 ccm Wasser gefunden, so daß, wenn noch weniger Erde wie dieser Betrag verwendet wurde, überhaupt kein Nitrat und Nitrit mehr angezeigt werden konnte. Wenn man also für den beschriebenen Versuch mehr als 50 ccm Wasser und weniger als 0,5 g Erde für die ursprüngliche, das heißt, für die Stickstoffbindung notwendige Impfung verwendet hat, so zeigt schon bei positivem Erfolg der genannten Reaktion dieses qualitative Resultat ohne

jede quantitative Bestimmung an, daß atmosphärischer Stickstoff nitrifiziert ist¹⁾.

Zusammenfassung und Schluß.

Die zwei wichtigsten Accumulationsverfahren von Oligonitrophilen, welche zu Bakterienkulturen führen, wodurch eine kräftige Bindung des freien Stickstoffs stattfindet, sind: Erstens, das Verfahren der vollständigen Rohkultur; zweitens, das Verfahren der partiellen Rohkultur.

Die vollständige Rohkultur wird, wie folgt, eingerichtet: 100 Leitungswasser, 2 Mannit und 0,6 K²HPO⁴, in dünner Schicht in einem geräumigen Erlemeyer-Kolben wird mit frischer Gartererde infiziert und bei 23—25° C kultiviert. Am 3. Tage entsteht eine Bakterienkultur, worin *Chroococcum* vorherrscht. Nach ein paar Ueberimpfungen sind die meisten Verunreinigungen zwar verschwunden, doch bleiben immer einzelne Fluorescenten, welche in der Mannitlösung keine Säure erzeugen. Impft man dann in 100 cem Leitungswasser 2 Glukose, 0,05 K²HPO⁴, so entsteht die Kombination *Chroococcum* — *Granulobacter* (in mehreren Arten) — *Radioacter* und daraus erzielt man den höchsten bisher gewonnenen Ertrag von 7 mg gebundenem Stickstoff pro g assimiliertem Zucker. Hieraus kann nicht weiter übergeimpft werden in die gleiche Glukoselösung wegen der Säurebildung durch die Fluorescenten, wodurch das Wachstum eingeschränkt wird.

Setzt man die Ueberimpfung dann aber wieder in die Mannitlösung fort, oder befolgt man die Methode der „Wechselkultur“, wobei Acetat als Kohlenstoffnahrung gegeben wird, welches von *Granulobacter* nicht verwendet werden kann, so kommt man schließlich auf die Kombination von den zwei sporenfreien Arten

1) Historische Notiz. Nachdem unsere Abhandlung über Oligonitrophilie in No. 16 des Centralbl. f. Bakt. II. Abt. Bd. VII, 1901 erschienen war (meine Mitteilungen über Oligonitrophilie in der Akademie der Wissenschaften zu Amsterdam, datieren vom 30. März und 25. Mai 1901), machte Herr Dr. W. Krüger aus Halle a. S. uns in einem Schreiben vom 4. Sept. 1901 auf einen Passus in seiner Arbeit in den landwirtschaftl. Jahrb. 1900, p. 741 aufmerksam, welcher hier wörtlich folgt: „Hier mag zunächst noch ein Versuch kundgegeben werden, der dafür Zeugnis ablegt, daß unter denselben Verhältnissen, unter welchen wir die Algen züchteten“ Herrn Krüger's Arbeit beantwortet die Frage: „Sind niedere chlorophyllgrüne Algen in stande, den freien Stickstoff zu assimilieren?“ in negativem Sinne; „bei Organismen, welchen das Vermögen eigen ist, sich des freien Stickstoffs der Luft als Stickstoffquelle zu bedienen, Stickstoffaufnahme aus der Atmosphäre stattfindet. Von mehreren Versuchen sei hier das Ergebnis eines derselben mit einem aus dem Boden gezüchteten Organismus angeführt. Dann wurde wieder eine Nährungsflüssigkeit ohne Zusatz von Stickstoffverbindungen, der pro 100 cem nur 0,0003 g Stickstoff enthält, verwendet.“ Es zeigten nach 62 Tagen 100 cem eine Zunahme von 4,6 mg, 20 cem von 1,8 mg und 100 cem von 8,5 g. Herr Krüger fährt dann fort: „Es wurden also nicht unbeträchtliche Mengen von elementarem Stickstoff assimiliert und die Entwicklung der Kulturen machte keineswegs den Eindruck, daß dem Organismen irgend ein wichtiger Nährstoff nicht zu Gebote stand.“ Der Organismus, wovon hier gesprochen wird, war *Chroococcum*, wie wir konstatieren konnten, durch eine Kulturröhre, welche Herr Krüger seinem Briefe beigelegt hatte, worin sich allerdings keine Reinkultur, sondern ein kompliziertes Mikrobengemisch vorfand.

Chroococcum + Radiobacter, welcher in der Mannitlösung ca. 4 mg Stickstoff pro Gramm assimilierten Mannit binden kann. Granulobacter ist darin nicht mehr gegenwärtig, jedoch bleiben auch dann noch Fluorescenten nachweisbar und in geringer Anzahl auch Aërogenes und Coli.

Das Verfahren der partiellen Rohkultur wird, wie folgt, ausgeführt: Entweder 100 Leitungswasser, 2 Mannit, 0,05 K^2HPO^4 , oder 100 Leitungswasser, 2 Glukose, 2 Kreide, 0,05 K^2HPO^4 wird infiziert mit Chroococcum + parteurisierter Erde und es wird wieder bei 23—28° C kultiviert. Hierbei entsteht nach wiederholter Ueberimpfung die stickstoffbindende Kombination Chroococcum + Granulobacter in mehreren Arten und als Verunreinigung einzelne andere accessore Sporenbilder. Der höchste bei dieser Versuchsanstellung erzielte Ertrag an gebundenem Stickstoff, nämlich 5 mg gebundener N pro g Zucker (Vers. 49) wurde mit Chroococcum + dem aëroben, aber stark mikroaërophilen Granulobacter reptans erhalten.

Alle Granulobakterien sind mehr oder weniger mikroaërophil. Das Maß dieser Eigenschaft ist sofort den Kolonien auf Glukoseagar vermittels der Jodreaktion anzusehen, indem die am meisten mikroaërophilen auch am meisten Granulose enthalten und sich deshalb dunkelblau färben, während die weniger mikroaërophilen (mehr aëroben) mit Jod lichtblau werden¹⁾.

Ueberhaupt scheint die Assimilation des freien Stickstoffs parallel zu gehen mit Mikroaërophilie bei den in Bezug kommenden Arten. Diese Eigenschaft äußert sich dadurch, daß im Kulturtropfen in der feuchten Kammer, entweder durch Wachstum oder durch Bewegung, Anhäufungen entstehen, welche nicht im Meniscus selbst, sondern in einiger Entfernung davon nach innen vorkommen, wo ein geringerer Druck der gelösten Luft herrschen muß. Die Stimmung für dieses niedere Druckoptimum geht, wenigstens bei Granulobacter, bei fortgesetzter aërober Kultur erblich verloren und damit verschwindet der für die Stickstoffbindung notwendige Accommodationszustand. Aus diesem Verlust des Accommodationszustandes bei aërober Kultur muß erklärt werden, warum die Kombinationen von bekannten reinkultivierten Arten quantitativ nur dann viel Stickstoff binden, wenn sie frisch aus den Rohkulturen isoliert sind.

Das Hauptresultat der vorliegenden Untersuchung ist nach unserer Meinung der Nachweis, daß, wie schon in der Einleitung hervorgehoben, bei der Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien zunächst eine lösliche Stickstoffverbindung entsteht, welche sich außerhalb der aktiven Organismen in die Umgebung verbreitet und dort auch für andere Mikroben²⁾ erreichbar ist.

1) Durch diesen einfachen Versuch kann man „Alinitbakterien“ erhalten, welche nicht nur in der Phantasie des Forschers, sondern auch wirklich in stande sind, freien Stickstoff zu binden, entweder ganz allein oder bei Gegenwart von Chroococcum. Hierbei muß man sich aber hüten, die Granulosereaktion nicht zu verwechseln mit der für die Megatherium-Gruppe so auffallenden Glykogenreaktion.

2) Oder, wie im Falle von Radicicola für eine höhere Pflanze.

Warum diese bisher in ihrer chemischen Natur noch nicht erkannte Verbindung im allgemeinen so schwierig von den erzeugenden Arten selbst, und dagegen so leicht durch *Chroococcum* aufgenommen und für Wachstum verwendet wird, ist noch nicht aufgeklärt. Allerdings sind die Beziehungen von letzterer Art zu den Stickstoffverbindungen überhaupt exceptionelle, nicht nur in Bezug auf die außerordentliche Gier, womit sie die geringsten Spuren dieser Stoffe aus den Lösungen an sich zieht, sondern auch in Bezug auf die qualitativen Einwirkungen, welche sie darauf ausübt. Es hat sich nämlich herausgestellt, daß *Chroococcum* eine der wenigen bisher bekannten Bakterien ist, welche aus Nitraten und Nitriten direkt Ammon erzeugen können¹⁾, was aber durch *Chroococcum* aus den ersteren mit solcher Intensität stattfindet, daß der Nachweis der dabei sicher stattfindenden vorübergehenden Nitritbildung unter günstigen Wachstumsverhältnissen überhaupt nicht gelingt²⁾. Soviel uns bekannt, steht *Chroococcum* in dieser Beziehung allein.

Zwar wird auch von gewissen anderen Bakterien NH^3 aus Nitraten und Nitriten hervorgebracht, jedoch auf eine andere Weise, wie aus folgender Uebersicht, wobei die von lebenden Kartoffeln isolierten *B. subtilis* und *B. mesentericus* mit *Chroococcum* in Parallele gebracht sind, hervorgeht. Dabei ist Kulturflüssigkeit

- 1 Leitungswasser 100
Calciummalat 2
 K^2HPO^4 0,05
 KNO^3 0,05
- 2 Wie 1, aber KNO^2 anstatt KNO^3 .
- 3 Wie 1, aber Mannit anstatt Calciummalat.
- 4 Wie 3, aber KNO^2 anstatt KNO^3 .

	Kulturflüssigkeit			
	1 CaMalKNO ³	2 CaMalKNO ²	3 Mannit KNO ³	4 Mannit KNO ²
<i>Chroococcum</i>	NH^3 , kein KNO^2	NH^3	NH^3 , kein KNO^2	NH^3
<i>Mesentericus vulgatus</i>	NH^3 und KNO^2	kein NH^3	NH^3 und KNO^2	NH^3
<i>Subtilis</i>	NH^3 und KNO^2	kein NH^3	Kein NH^3 , nur KNO^2	Kein NH^3

Wie zu erwarten war, gehört *Polymyxa* mit seinen Varietäten *Tenax* und *Mucosum* ebenso zu den Ammonbildnern aus Nitraten und Nitriten, wie *Mesentericus*. Für *Sphaericum*

1) Dagegen ist die Ammonbildung aus Amiden und Eiweißkörpern eine bei den Bakterien sehr allgemein vorkommende Funktion und wohlbekannt durch die Krystalle des Ammonmagnesiumphosphats alter Agar- und Gelatinekulturen der verschiedensten Arten.

2) Bei verlangsamtem Wachstum und ungünstigen Lebensbedingungen konnte allerdings auch bei *Chroococcum* Nitritbildung aus Nitrat nachgewiesen werden.

und Reptans ist dieser Nachweis noch nicht gelungen, wahrscheinlich aber wegen mangelhafter Versuchsanstellung.

Aus diesen Angaben ersieht man, daß die Ammonbildung aus KNO_2 bei Malat als Kohlenstoffquelle nur für *Chroococcum* nachgewiesen werden konnte, und nicht für beide anderen Arten, welche sich dagegen durch die kräftige Nitritbildung von *Chroococcum* scharf unterscheiden.

Denitrifikation, das heißt Entbindung von freiem Stickstoff aus Nitriten, findet weder durch *Chroococcum* noch durch die beiden anderen Arten statt.

Die Frage, ob das unbekannte nach außen abgeschiedene Assimilationsprodukt des freien Stickstoffs vielleicht Nitrit sein könnte, wurde vielfach erwogen, jedoch konnte in den Kulturen während der Stickstoffbindung keine Spur von Nitriten entdeckt werden, und ebenso wenig Ammon bei Gegenwart von *Chroococcum*. Die Annahme, Nitrite seien zwar vorübergehend gebildet, jedoch sofort verschwunden, weil für Ammonbildung durch *Chroococcum* und das Ammon für Wachstumszwecke durch diese oder andere Bakterien verwendet, ist nicht geeignet, theoretisch zu befriedigen, weil die Stickstoff assimilierenden Granulobakterien sich schwierig mit ihrem eigenen Assimilationsprodukt, leicht dagegen mit Nitriten zum Zwecke ihres Stickstoffbedürfnisses ernähren können.

Die Möglichkeit, daß vielleicht ein Salz gebildet werde von Hydrazin oder Hydroxylamin wurde gleichfalls vorausgesetzt und auf Grund der reduzierenden Eigenschaften dieser Körper die entsprechenden Reaktionen versucht, jedoch ohne daß ein bestimmtes Resultat erhalten wurde.

Schließlich sei hier noch betont, daß *Chroococcum* unter allen Umständen, auch bei Gegenwart von Glukose und anderen Zuckerarten, ein Alkalibilder ist, was übrigens ebenfalls zutrifft für *Radiobacter*.

Aufklärung in Bezug auf den Chemismus der Stickstoffbindung geben diese Betrachtungen zwar nicht, doch beziehen sie sich auf Thatsachen, die eine dereinstige Erklärung vielleicht anbahnen.

Wir betrachten es als gesichert, daß alle Arten von *Granulobacter*, anaërobe und aërobe, unter Umständen imstande sind, die von ihnen erzeugte Stickstoffverbindung, wenn auch schwierig, für ihr eigenes Wachstum zu verwenden, also in Reinkulturen den freien Stickstoff zu binden. Winogradsky hat letzteres schon für das Buttersäureferment angegeben und wir konnten uns sowohl für dieses, wie für das Butylferment von der Richtigkeit dieser Angabe überzeugen. Was die aëroben Formen dieser Gattung anbelangt, so gelang uns der Nachweis für einen bestimmten Stamm von *Polymyxa*, doch waren andere Isolierungen nicht imstande, ohne Hilfe von *Chroococcum* in unseren stickstofffreien Kulturflüssigkeiten zu wachsen. Auch eine Reinkultur von *Mesentericus vulgaris*, welche mit Hilfe von Scheiben lebender Kartoffeln aus Erde isoliert war, assimilierte in einem Falle, ohne Mithilfe von anderen Bakterien, freien Stickstoff, doch war das Vermögen schon nach einer Ueberimpfung verloren.

Alles weist darauf hin, daß auch im Boden eine durch die Stickstoff assimilierenden Bakterien erzeugte Verbindung sich nach allen Seiten fortbewegt und also auch von anderen Organismen als Stickstoffnahrung verwendet werden kann. Besonders *Chroococcum* wird auch im Boden dadurch eine wichtige Rolle erfüllen, und wir haben gezeigt, daß das Protoplasma dieser Bakterie leicht in Ammon verändert und dann nitrifiziert werden kann, wodurch es gelingt, in kurzer Zeit den freien atmosphärischen Stickstoff in Nitrat umzuwandeln.

Zur Erklärung der außerordentlichen Förderung, welche *Chroococcum* auf die künstliche Kultur speziell von *Granulobacter* ausübt, muß noch daran erinnert werden, daß letztere Arten Säure erzeugen, welche ihre eigene Funktion hemmt, durch *Chroococcum* aber teilweise neutralisiert, anderenteils oxydiert werden kann.

Was *Radiobacter* betrifft, so muß auch diese Art ein zunächst an die Umgebung abgegebenes Produkt aus dem Stickstoff erzeugen, welches, wenigstens für *Chroococcum*, als Stickstoffnahrung dienen kann, und sicher auch für *Radiobacter* selbst, wenn *Chroococcum* gegenwärtig ist. Ueberhaupt erinnert das Verhältnis zwischen diesen beiden Bakterien in hohem Maße an dasjenige von dem mit *Radiobacter* nahe verwandten *Radiciicola* zu der *Papilionaceen*pflanze.

Die Beobachtung, daß gewisse Varietäten von *Radiobacter* kräftig denitrifizieren, das heißt aus Nitraten und Nitriten bei geeigneten Nahrungsbedingungen freien Stickstoff abspalten, hat uns Veranlassung gegeben, die Frage zu stellen, ob vielleicht auch andere denitrifizierende Bakterien bei der Symbiose mit *Chroococcum* den freien Stickstoff binden können, doch haben wir dabei keinen positiven Erfolg erreicht.

Bakteriologisches Laboratorium des Polytechnikums.

Delft, 14. Juni 1902.

Nachdruck verboten.

Clostridium Pastorianum, seine Morphologie und seine Eigenschaften als Buttersäureferment.

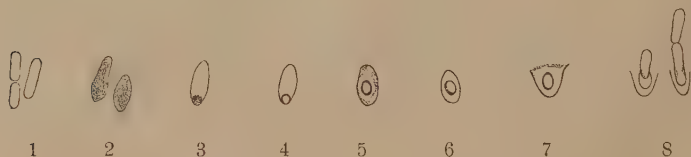
Von Prof. Dr. S. Winogradsky in St. Petersburg.

Mit 1 Tafel und 1 Figur im Text.

Im Jahre 1895 habe ich einen *Bacillus*, den ich im Boden entdeckte und *Clostridium Pastorianum* benannte, ausführlich untersucht und nachgewiesen, daß dieser Organismus, ein Buttersäureferment, in stickstofffreien Medien leben und freien Stickstoff assimilieren kann, indem er gleichzeitig Zucker in gewissem Verhältnis zur Stickstoffassimilation vergärt. Abgesehen von dem komplizierten und damals noch unaufgeklärten Falle von der Stick-

stoffassimilation seitens der Leguminosen in Symbiose mit Bakterien und dem noch gänzlich unklaren von der Assimilation seitens der Algen, war das der erste Fall, wo man bei einem bestimmten Organismus, einer Bakterienspecies, diese Fähigkeit nachwies und durch direkte Versuche den Mechanismus der Stickstoffassimilation studieren konnte. So ist es denn verständlich, daß meine erste Abhandlung über das Thema¹⁾ ganz dieser Frage gewidmet wurde und daß ich die sonstigen Charaktere des Mikrobiums, nämlich seine Morphologie und seine Eigenschaften als Buttersäureferment, nur kurz berührte. Ich wollte dies bald nachholen, wurde aber durch verschiedene Umstände abgehalten und es blieb die Arbeit bis jetzt unpubliziert. Da ich aber von Kollegen nicht selten Anfragen über die Merkmale des betreffenden Mikroorganismus bekomme, welche mir zeigen, daß die Isolierung und die Identifizierung desselben infolge meiner vielleicht zu kurz gehaltenen Beschreibung Schwierigkeiten bietet, so entschieße ich mich, nachträglich doch diese Lücke auszufüllen, um so mehr, als der Organismus in mancher Hinsicht unser Interesse verdient.

Was seine Morphologie anbetrifft, so geben wir gleich, um die Beschreibung möglichst zu verkürzen, das anbei stehende Schema seines Entwicklungszyklus. Die mit 1 bis 8 nummerierten Figuren stellen die aufeinanderfolgenden Wachstumsstadien des Bacillus dar, und auf diese nehmen wir in der folgenden Beschreibung Bezug. Dieselben wird man dann auf den Photogrammen leicht erkennen und wiederfinden.



Stadium 1. Junge Bacillen, meistens 1,2—1,3 μ dick, 1,5—2 μ lang; bleiben bei günstigen Bedingungen gewöhnlich kurz infolge der wiederholten lebhaften Teilungen; sie sind meistens gerade, cylindrisch, mit abgestutzten Enden; färben sich rasch und intensiv mit gewöhnlichen basischen Anilinfarben. Jod läßt sie gelb. Das ist das Stadium der Vermehrung des Mikrobiums, das eigentliche Propagationsstadium. Dies dauert, durch immerwährende Zweiteilungen neu entstehend, bis die Vermehrung und auch die Gärung ihren Höhepunkt erreicht hat. Mit dem Aufhören der Teilungen wird das nächste Stadium eingeleitet.

Stadium 2. Die verlängerten Stäbchen, statt sich zu teilen, haben sich zu Spindelform aufgebläht, indem gleichzeitig ihr Plasma das charakteristische körnige Aussehen bekommt. Anilin-

1) Recherches sur l'assimilation de l'azote libre de l'atmosphère par les microbes. (Archives des sciences biologiques. T. III. Lf. 4.)

farben färben jetzt schwächer, durchsichtiger, dagegen ruft Jod die intensivste violettbraune Färbung hervor.

Stadium 3. Es tritt an einem Pole der Spindel ein sporogenes Korn (in Einzahl) auf, das gleich bei seinem Auftreten die ovale Form der fertigen Sporen besitzt, doch kleiner ist; Methylenblau färbt es fast schwarz, die übrigen Teile der Zelle dagegen hellblau. Umgekehrt wird durch Jod der durch Methylenblau hell gefärbte Teil ganz dunkel violettbraun, das sporogene Korn fast farblos.

Stadium 4. Das sporogene Korn wird größer und rundet sich ab; es färbt sich jetzt nur schwer mit gewöhnlichen Anilinfarben, behält aber schon etwas die Ziehl'sche Färbung. Die Mutterzelle färbt sich noch mit Jod, aber schwächer.

Stadium 5. Die Spore bekommt ihre entgeltige Größe und liegt meistens nicht mehr polar, sondern mehr in der Mitte der Mutterzelle und ist mit einem hellen Hof umgeben. Jod giebt nur noch in der Peripherie einen schwachen violetten Saum oder giebt der Zelle ein eigentümliches violett marmoriertes oder gespenkeltes Aussehen.

Stadium 6 beginnt mit dem Verschwinden der charakteristischen Jodfärbung. Die Spore ist reif und trotzdem zeigt die dieselbe umschließende Mutterzelle keine Zeichen der Verquellung oder Zerstörung, wie man das so allgemein bei der endogenen Sporenbildung der Bacillen beobachtet; sie ist nunmehr mit einer hyalinen Substanz (um die Spore herum) gefüllt, immer aber scharf contourniert; durch Anilinfarben wird ihre Membran gut gefärbt, die hyaline Substanz dagegen kaum.

Nur wird, höchst wahrscheinlich durch die aufquellende „hyaline Substanz“, die Membran der Mutterzelle an einem Pole gesprengt und weit geöffnet: Stadium 7. Die reife Spore, $1,6 \mu$ lang, $1,3 \mu$ breit, liegt jetzt in einem abgerundet dreieckigen Gallertpolsterchen, der „Sporenkapsel“, eingebettet, das an zwei Seiten scharfe und an der dritten — der Oeffnung — verwaschene Contouren zeigt. Am schärfsten treten diese Verhältnisse hervor, wenn man die reifen Sporen nicht in Flüssigkeit, sondern in feuchter Luft untersucht, indem man also das Wasser von unten unter dem Deckglase wegsaugt oder fast austrocknen läßt (s. Photgr. 2). Es kann selbstverständlich kein Zweifel aufkommen, daß diese „Sporenkapsel“ ein Produkt der Metamorphose der Mutterzelle ist.

Sobald man frisch gereifte, sowie mehrere Jahre alte Sporen in frische zuckerhaltige Nährlösung unter anaëroben Bedingungen bringt, beginnt sofort die Keimung, welche in ganz charakteristischer Weise erfolgt. Die Spore schwillt bedeutend an und wird, als erstes Zeichen der beginnenden Keimung, durch wässeriges Methylenblau oder Gentiana färbbar. Dann wird die Sporenwand an dem gegen die Kapselöffnung gerichteten Pole der Spore durchlöchert, und das junge Stäbchen tritt, die Sporenwand zurücklassend, aus dieser und der Sporenkapsel heraus: Stadium 8. Es ist bemerkenswert, daß die polare Keimung immer in der Richtung gegen die Kapselöffnung erfolgt,

woraus zu erhellen scheint, daß diese Richtung von dem Bau der Sporenkapsel bestimmt wird. Manchmal beginnt das noch in der Kapsel teilweise steckende Stäbchen sich sofort zu teilen, und auf diese Weise entstehen Bacillenpaare, sowie kurze Ketten, auf deren einem Ende die Sporenkapsel wie ein Fingerhut noch aufsitzt. Es ist nicht schwer, jeder Art Keimungsbilder in Fülle zu beobachten; es genügt, den Kreidebodensatz alter Kulturen in ein Röhrchen mit 2-proz. Zuckernährlösung (mit Pepton oder Ammoniak) einzubringen und das Röhrchen im sauerstofffreien Raume bei 30° stehen zu lassen: Dann untersucht man bei Zeichen einer beginnenden Gasentwicklung, etwa nach 20 Stunden. Oder man setzt einfach etwa 1 g Glykose zu einer ausgegorenen kombinierten (gemischten) aeroben Kultur des *Clostridium Pastorianum* und läßt etwa 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Man findet dann nicht selten in einem Präparate alle möglichen Keimungsbilder, die den Prozeß in allen Details lückenlos zu reproduzieren gestatten.

Merkwürdig, daß nach Auskeimung der Sporen die zurückgebliebene Sporenwand samt Sporenkapsel noch eine Zeit lang so deutlich sichtbar bleibt, daß man zweifeln möchte, daß man nur leere Hüllen vor sich hat.

Wie man sieht, zeigt die Morphologie von *Clostridium Pastorianum* einige interessante Eigentümlichkeiten, welche ihm den Charakter eines höchst differenzierten bakteriellen Organismus verleihen. Wenn auch zwischen ihm und verwandten Arten, wie *Clostridium butyricum*, *Amylobacter*-, *Granulobacter*-Arten, bezüglich der Form und des Wachstums der jungen Stäbchen, der Verwandlung derselben in die *Clostridium*-Form, dem Auftreten der amyloiden Substanz innerhalb derselben, dem Sporenbildungsprozeß, soviel man urteilen kann, vollkommene Analogie zu herrschen scheint, so treten doch bei dem Sporenreifungsprozeß ganz charakteristische Besonderheiten hervor: Die Differenzierung der Mutterzelle zu einer „Sporenkapsel“, die „Öffnung“ derselben, der Bau der Spore und der eigentümliche, durch diesen Bau bedingte Keimungsprozeß. Zu bemerken ist noch, daß diese Sporenkapseln, einmal gebildet, ebenso beständig sind, wie die Sporen selbst. Diese können aber mehrere Jahre lang in der abgegorenen Flüssigkeit konserviert werden und bleiben unverändert und gut keimungsfähig. Ich habe jetzt bereits 7 Jahre altes Sporenmaterial und zeigen die Sporen immer ebenso schöne Sporenkapseln als am Anfange.

Zur besseren Illustration der geschilderten morphologischen Verhältnisse soll die beigegebene Tafel mit Photogrammen dienen. In Fig. 1 sieht man die Stadien 1, 2, 3, d. h. kurze, sich lebhaft teilende, längere, bereits zu Spindeln anschwellende, mit hellerem körnigen Inhalt, schließlich auch einen polar gestellten sporogenen Korn tragende Stäbchen. Stadium 4, 5, 6 sind in Fülle in Fig. 3 und 4 zu finden, obgleich das Bild hier etwas abnorm aussieht, worüber unten mehr. Fig. 2 — ein Präparat in feuchter Luft — zeigt in deutlicher Weise die Struktur der reifen Sporengebilde.

Endlich ist es auch Herrn Omeliansky gelungen, auch den Sporenkeimungsprozeß Schritt für Schritt photographisch zu illustrieren. In Fig. 7a sieht man die ersten Anfänge der Keimung; die nicht mehr stark lichtbrechende aufgequollene, mit wässerigem Methylenblau gefärbte Spore; auf b — das aus der Spore hervortretende, auf c — das bereits aus der Sporenwand hervorgetretene, aber noch in der Sporenkapsel steckende Stäbchen. In Fig. 5 sieht man neben noch ruhenden Sporen und eben gekeimten jungen Stäbchen alle Keimungszustände nebeneinander: etwa 5a und etwa 10b und c, darunter längere Bacillenpaare oder Ketten, mit einem Ende noch in der Spore steckend.

Ein noch nicht ganz aufgeklärter Punkt ist die Schwärmerbildung bei *Clostridium Pastorianum*. Einige Male habe ich sie ganz deutlich beobachtet. Beweglich sind hauptsächlich die jungen Stäbchen und zwar einzeln oder paarweise unter starker Rotation des einen Körperendes. Seltener sieht man spindelförmige Individuen sich bewegen, noch seltener bereits sporogene Körner tragende. Am ehesten kann man Schwärmer treffen, wenn man aus anaëroben, durch reinen Stickstoff durchzogenen, lebhaft gärenden Kulturen einen Tropfen Flüssigkeit schöpft und sofort unter dem Deckglas untersucht. Einige darauf gerichtete Versuche, massenhafte Schwärmerbildung hervorzurufen, haben nicht zum Ziele geführt. Daher ist es auch nicht gelungen, Geißelfärbung zu bekommen. Zweifellos ist die Schwärmfähigkeit, obgleich vorhanden, doch eine sehr begrenzte.

Den geschilderten Entwicklungsgang kann man als den normalen bezeichnen. Ihn beobachtet man vorzugsweise bei Kulturen in stickstoffarmen oder stickstofffreien, mit einem Ueberschuß von Kreide versetzten Zuckerlösungen, unter aëroben Bedingungen — und dann natürlich in Gesellschaft von aëroben Arten — oder in anaëroben, indem man durch die Lösung einen Stickstoffstrom unterhält.

Auf Kartoffel und Mohrrübe in Reinkultur im Vakuum oder sauerstofffreiem Raume sehen die Wuchsformen des Bacillus meistens etwas anders aus: Statt der kurzen, cylindrischen, geraden Stäbchen des Propagationsstadiums treten hier oft längere und meistens auch dickere Stäbchen oder Fäden auf, nicht selten vibrionenartig gekrümmt und gewunden. An den Fäden beobachtet man manchmal einen seltsamen Vorgang, nämlich die Abschnürung von kleinen kokkenartigen Gebilden in mäßiger Menge, welche, soviel ich weiß, nicht mehr entwicklungsfähig sind. Die Anschwellung von Stäbchen und Fäden zur *Clostridium*-Form beginnt früh, geht aber unregelmäßig vor sich: Bald findet man kurze, stark aufgeblähte, bald längere und schlankere Spindeln, bis zu sehr großen, eher wie Involutionsformen aussehenden angeschwollenen Fäden, auch krumme Gebilde etc. Die Sporenbildung geht nur teilweise normal vor sich; ein Teil der aufgeblähten Formen kommt überhaupt nicht zur Sporenbildung und stirbt ab, so daß lebende Zellen von abgestorbenen im Zerfallen begriffenen, umgeben sind¹⁾.

1) Da von dem Mikrobium bewachsene Kartoffeln und Möhren einen

Die Photogramme 3 und 4 geben charakteristische Bilder der Kartoffelkulturen. Fig. 3 stellt ein jüngeres, Fig. 4 ein älteres Stadium vor. Auf der ersteren sieht man alle die eben geschilderten Vorgänge: Längere Stäbchen und Fäden, kokkenartige Gebilde, kürzere und längere Clostridium-Formen, zum Teil sporentragend, hie und da monströse Formen, Detritus u. s. w. Auf der letzteren fast nur Clostridienformen in verschiedenen Stadien der Sporenbildung.

Wenn man nach Auftreten dieser Abnormitäten die Kulturbedingungen unverändert beibehält, so werden die Degenerationserscheinungen immer ausgeprägter: Immer mehr wachsen die Stäbchen zu Fäden heran, wogegen die Clostridium-Bildung und mit ihm die Sporenbildung zurücktritt. Endlich wird das Mikrobium gänzlich asporogen. Ist einmal die Sporenbildung verschwunden, so gelang es uns nicht wieder, dieselbe zu restituieren. Es hatte sich dann gleichsam eine asporogene Varietät gebildet, in welcher man die frühere charakteristische Art kaum mehr erkannte. Nicht nur morphologisch war sie nicht mehr die frühere, sondern auch physiologisch, und das möchten wir besonders hervorheben. Man hatte nun eine „abgeschwächte“ Varietät vor sich, welche, was ihre Gärkraft und besonders ihre Fähigkeit, elementaren Stickstoff zu assimilieren, anbetrifft, nicht mehr leistungsfähig war.

Noch schlagender sind die Veränderungen, welche die Kultur unter den gewöhnlichen Bedingungen eines anaëroben Gärversuches im Wachstum von Clostridium Pastorianum hervorruft. Läßt man es in einer reichlich mit Pepton, Asparagin oder Ammoniak versetzten, 1 bis 2-proz. Glykoselösung in einem bis an den Pfropfen gefüllten Kolben wachsen, so tritt mehr oder weniger intensive Gärung ein, und der Zucker wird bei Gegenwart von überschüssiger Kreide vollständig vergoren. Doch die mikroskopische Untersuchung zeigt dann ein befremdliches Bild. Trotzdem die vergorene Lösung mit dem charakteristischsten Material reichlich geimpft war, sieht man jetzt nämlich nur langgliedrige Fäden und zwar in ganzen Knäueln, sonst aber nichts mehr, keine Clostridium-Formen und keine Sporen; nur hie und da bilden einzelne in dem Fadenverbände befindliche geschwollene Glieder die einzige Andeutung einer Weiterentwicklung. Auch das sonstige Aussehen der Fäden und ihre Färbbarkeitsverhältnisse lassen keinen Zweifel übrig, daß sie zum Teil abgestorben, zum Teil dem Absterben nahe sind. In der That gelingen Abimpfungen aus solchem Material nur selten. Es fragt sich nun, was die Ursache einer so rapiden Degeneration von Clostridium Pastorianum unter Bedingungen ist, die als für die anaëroben Buttersäurefermente sehr günstig angesehen werden können? Einen so ausgesprochen schädlichen

penetranten Buttersäuregeruch entwickeln und stark saure Reaktion zeigen, so lag die Vermutung nahe, diese der schädlichen Wirkung zu beschuldigen. In der That treten, wenn man die Kartoffel- und Rübenstücke vor der Sterilisation mit Kreidepulver anreibt, diese Abnormitäten weniger deutlich hervor.

Einfluß den Zerfallsprodukten von Zucker zuzuschreiben, zumal in einer so verdünnten Lösung, scheint ganz unwahrscheinlich, um so mehr als in derselben Zuckerlösung, mag sie stickstoffarm oder stickstofffrei sein, die Entwicklung anaërob in Reinkulturen ganz normal vor sich geht. Wären dann etwa die zugesetzten Stickstoffverbindungen daran schuld? Das scheint uns wohl möglich. Man könnte denken, daß das an das Wachstum ohne gebundenen Stickstoff angepaßte Clostridium Pastorianum einigermaßen bedeutende Mengen stickstoffhaltiger Nährstoffe nicht mehr erträgt: es wächst und gärt, doch gärt es sich regelmäßig zu Tode.

Ersetzt man Dextrose durch eine andere von Clostridium Pastorianum vergärbare Zuckerart, so bleibt das ohne Einfluß auf das Endresultat.

Erfahrungen dieser Art zeigen, wie wichtig es ist manchmal, genaue morphologische Kenntnisse zu haben über den Organismus, mit welchem man experimentiert. Stehen diese nicht zur Verfügung, so kann es leicht passieren, daß man degeneriertes Material zu Versuchen benutzt und daher sich falsche Vorstellungen über die normalen Eigenschaften des zu untersuchenden Organismus bildet. Indem wir schließlich an der Regel festhielten, nur mit normal wachsendem, reichlich sporenbildendem Material zu experimentieren, sind uns manche Mißerfolge erspart geblieben.

Was die Züchtung von Clostridium Pastorianum betrifft, so werden wir die von uns angewendeten Verfahren hier nur kurz anführen, indem wir bezüglich der Einzelheiten auf die citierte ausführliche Abhandlung verweisen.

Anaërob in Reinkulturen schien es am besten zu gedeihen unter folgenden Bedingungen: Nährflüssigkeit, stickstofffrei, enthaltend Dextrose 2 Proz. Ueberschuß von reiner frisch gewaschener Kreide.

Nährsalze:

Kaliumphosphat	1 g
Magnesiumsulfat	0,2 g
Natriumchlorid	{ sehr geringe Menge
Ferrosulfat	
Mangansulfat	

Dest. Wasser (ammoniakfrei) 1 l.

Kulturgefäße: Waschflaschen (kleinere) oder sogenannte Drechsel'sche Flaschen mit aufgeriebenem Aufsätze, luftdicht zu einer Reihe verbunden, die mit dem Schloesing'schen Stickstoffentwicklungsapparate in Verbindung steht und mit einer konzentrierte Schwefelsäure enthaltender Waschflasche schließt. Die Flaschen werden mit Flüssigkeit nur zu $\frac{2}{3}$ gefüllt. Nach erfolgter Sterilisation im Autoklaven wird die erstere in der Reihe geimpft und durch einen stärkeren Stickstoffstrom die Luft aus dem ganzen System ausgetrieben. Nachdem die geimpfte Flasche in Gärung geraten ist, treibt man durch momentane vorsichtige Neigung derselben ein kleines Tröpfchen in die zweite, von dieser in die dritte u. s. w. Während der ganzen Versuchs-

dauer unterhält man einen langsamen Stickstoffstrom durch das System.

Bei den gewöhnlichen Bedingungen der anaëroben Gärversuche ist es natürlich notwendig, gebundenen Stickstoff zuzusetzen. Als solchen haben wir Ammoniak, Asparagin und Pepton benutzt. Ueber diese Versuche wird weiter unten berichtet.

Auf festem Substrat ist es leicht, eine Kultur zu bekommen auf Kartoffel und Mohrrüben anaërob in zugeschmolzenen, luftfreien Röhren, nach Roux, oder in Petri'schen, im Vakuum gehaltenen Schalen. Auf Kartoffel bilden sich warzenförmige erhabene grau gelbliche Kolonien, welche einen Durchmesser von 1 mm und darüber erreichen und einen penetranten Geruch nach Käse verbreiten. Auf Möhren treten Gärungserscheinungen in den Vordergrund: es bilden sich Schauminseln, die schließlich zu einem die ganze Oberfläche bedeckenden, weißlichen Schleim zusammenfließen; nie und da sieht man festere Klümpchen, welche von den hervorspringenden Blasen hin- und hergestoßen werden.

Auf Zuckeragar ist es schwieriger, ordentliche Kulturen zu bekommen. Die Kolonien bieten nichts Charakteristisches dar: übrigens wird die Gallerte zu schnell durch die Gasentwicklung zerküffet.

Auf Nährgelatine gelingt es nicht, eine Kultur zu bekommen. Auf Nährbouillon verzweigert das Mikrobium meistens auch das Wachstum. Einige Male schien es jedoch darin schwach zu wachsen.

Wie ich in einer früheren Arbeit gezeigt habe, gelingt es, diese exquisit anaërobe Species auch aërob in stickstoffarmer oder stickstofffreier, in etwa 1 cm tiefer Schicht ausgebreiteter Zuckerrösung zu kultivieren, jedoch nur unter der Bedingung, daß ihr andere aërobe Arten beigemengt werden. Die Natur derselben ist nicht gleichgültig: mit einigen Arten wächst das *Clostridium Pastorianum* besser, und ist der Ertrag an assimiliertem Stickstoff größer, mit anderen dagegen wird es ganz entschieden in seinem Wachstum gehemmt. Demgemäß ist es eine der Hauptbedingungen des Gelingens der gemischten Kultur, passende assoziierte Arten zu wählen. Bei Impfung mit Erde in die geeignete Nährlösung stellt sich oft das passendste Mikrobengemenge von selbst ein.

Nachdem wir nun die Morphologie von *Clostridium Pastorianum* und seine Kultur besprochen haben, müssen wir noch die Frage über seine Verbreitung im Boden, seinen Nachweis und die Isolierung besprechen.

Man findet diese Art nicht in jedem Boden. In Petersburger Erde haben wir sie ganz regelmäßig in jeder Probe gefunden. Es genügt, nur etwa 1 g frischer Erde in die erwähnte Dextrose-Nährlösung zu werfen, um nach ein paar Tagen bei Zimmertemperatur Gärung zu bekommen. Ein gleich aus der Kreideschicht unter einem Schauminseln angefertigtes Präparat ließ auf den ersten Blick die charakteristische Art erkennen. Durch alle 2—3 Wochen wiederholte Umsaaten kann man das Material unter denselben Bedingungen jahrelang in Kultur erhalten. Nötigenfalls

isoliert man das Clostridium Pastorianum durch Erwärmen bis 75° (10 Min.) und nachherige anaerobe Kultur auf Kartoffel.

Parallel mit der Petersburger Erde haben wir wiederholt Erdbproben aus Südrußland, Gouv. Podolien und Wolhynien, untersucht. Die verschiedenen Proben, welche der Beschaffenheit nach zum Teil schweren, zum Teil leichteren, humusreichen, sehr fruchtbaren Lehm-boden vorstellten, waren an verschiedenen von einander entfernten Punkten entnommen, auf verschiedenen Feldern, so nach Brache, nach Weizen, Klee, Bohnen, im Garten, auf Wiesen u. s. w. Von 1893 bis jetzt hat der Schreiber dieser Zeilen, wie Herr Omelianski bis anderthalb Dutzend Bodenproben untersucht. Kein einziges Mal gelang es uns aber, das Petersburger Clostridium Pastorianum darin nachzuweisen. Trotzdem aber eine der Petersburger ganz ähnliche Art darin fehlte, beobachtete man bei Aussaat dieser Proben unter denselben Bedingungen dieselben Erscheinungen, d. h. eine intensive Gärung, Schaumbildung, Auflösung von Kreide, doch keinen so ausgesprochenen Buttersäuregeruch. Stickstoffbestimmungen nach Kjeldahl in den vergärten Lösungen zeigten auch eine deutliche Zunahme an gebundenem Stickstoff von ca. derselben Größe wie in Petersburger Kulturen. Die bakteriologische Untersuchung ließ uns als Ursache der Gärung den dicken Bacillus erkennen, welchen unser Photogramm No. 6 vorstellt. Die genauere Untersuchung seiner Entwicklung zeigte, daß er auch ein Clostridium ist, durch Jod sich blau färbt und Sporen, ähnlich der Petersburger Art, bildet. Er unterscheidet sich von demselben durch bedeutendere Dimensionen — Dicke der Stäbchen 1,6—1,8 μ , Länge der Sporen 1,9 μ , Dicke 1,5 μ — und noch dadurch, daß er bei den Bedingungen der aeroben gemischten Kultur nur eine sehr begrenzte Sporenbildung zeigt und manchmal fast asporogen erscheint. Auch scheint der von ihm hervorgerufene Gärungsvorgang verschieden zu sein. Für die Reinzüchtung bietet er viel größere Schwierigkeiten; thatsächlich ist es bis jetzt nicht gelungen, ihn auf irgend einem festen Substrat wachsen zu lassen. Infolge davon ist diese Clostridium-Art bis jetzt noch unvollständig untersucht, obgleich sie im Laboratorium seit Jahren als Clostridium aus Wolhynien bekannt ist. Offenbar vertritt sie daselbst dieselbe Funktion, welche anderswo durch Clostridium Pastorianum vertreten ist. Dies lehrt z. B. der folgende von Omelianski ausgeführte Versuch:

Vier breite Erlenmeyer-Kolben mit je 100 ccm stickstofffreier Nährlösung, 2 Proz. Dextrose enthaltend und mit je 4 g reiner, durch Fällung präparierter Kreide versetzt. Außerdem bekommt jeder je 1 Milligramm Stickstoff in Form von Ammoniumsulfat. Zwei von den Kolben werden aus einer unreinen Wolhynischen Kultur geimpft und beginnen nach 48 Stunden lebhaft zu gären; die übrigen zwei werden nicht geimpft und bleiben steril als Kontrolle. Alle vier werden während der ganzen Versuchsdauer unter einer geräumigen Glocke gehalten, worin nur Luft, die Schwefelsäure und Natron passiert hatte, Zutritt hatte. Nach 2 Wochen zeigen die Kulturkolben keine Spur von Zucker

mehr. Die mikroskopische Untersuchung zeigt eine üppige Entwicklung des erwähnten Mikrobiums und eine wenig bedeutende der ihm beigemengten Arten. Die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl giebt das folgende Resultat:

Stickstoffgehalt der Kulturkolben	No. 1	5,88 mg
"	No. 2	6,02 "
der Kontrollkolben	No. 1	1,70 "
"	No. 2	1,77 "

Auf 1 g Dextrose werden also auch hier, wie bei *Clostridium Pastorianum* ca. 2 mg freien Stickstoff assimiliert.

In Pariser Erde dagegen haben wir unter denselben Bedingungen ein Buttersäureferment konstatiert, das der Petersburger Art viel ähnlicher ist und obgleich auch etwas größer, doch sich leicht als *Clostridium Pastorianum*-Varietät erkennen ließ. Weitere Untersuchungen, namentlich von verschiedenen Seiten, werden hoffentlich die Frage von der Verbreitung dieser Gruppe von Mikrobien aufklären.

Wenn wir jetzt zur Physiologie von *Clostridium Pastorianum* übergehen, so läßt sich diese Art kurz charakterisieren als ein obligat anaërobes Buttersäurement, das die Fähigkeit besitzt, ohne gebundenen Stickstoff zu wachsen und zu gären, indem es dabei freien Stickstoff zu assimilieren imstande ist. Indem wir bezüglich dieser letzten Funktion auf eine frühere Arbeit hinweisen, wollen wir für diesmal nur seine Gärfunktion näher ins Auge fassen und untersuchen, auf welche Körper sich seine Gärthätigkeit erstreckt und welche die Produkte der letzteren sind.

Zur Beantwortung der ersten Frage sind von Omelianski auf meine Veranlassung drei Versuchsreihen mit verschiedenen Substanzen ausgeführt worden. Sämtliche Substanzen waren in 2-proz. Lösung genommen. In jeder Versuchsreihe erhielt die eine Hälfte der Kulturen Stickstoff in Form von schwefelsaurem Ammoniak, die andere in Form von Pepton. Sämtliche wurden in sauerstofffreiem Raume bei 30° gehalten. Die drei Versuchsreihen haben vollständig übereinstimmende Resultate gegeben und lassen sich, wie folgt, resumieren:

In Gegenwart von Pepton werden vergärt: Dextrose, Rohrzucker, Lävulose, Inulin, Galaktose und Dextrin. Werden nicht vergärt: Milchzucker, Arabinose, Stärke, Gummi, Mannit, Dulcit, Glycerin und Calciumlaktat.

In Gegenwart von Ammon als einziger Stickstoffquelle werden von allen diesen Körpern nur Dextrose, Rohrzucker und Inulin angegriffen. Auch Dextrose manchmal etwas schwer und nicht konstant.

Ungeachtet ihrer Eigenschaft, elementaren Stickstoff zu assimilieren, ist diese Species fast ebenso empfindlich unter den gewöhnlichen Bedingungen eines anaëroben Gärversuches gegen die Qualität der Stickstoffnahrung, wie manche andere. Mit Ammoniakstickstoff geht die Gärung schwer vor sich und es werden nur die offenbar am leichtesten für das Mikrobium angreifbaren Stoffe vergärt.

Was die Frage nach den Produkten der Gärung anbetrifft, so wollen wir zuerst einen charakteristischen Versuch anführen, wo die Gärung in einer keine Spuren von gebundenem Stickstoff enthaltenden Nährlösung, aber unter reichlichem Zutritt von reinem Stickgassich abspielte. Dazu wurden größere hermetisch schließende und zur Durchleitung von Gasen eingerichtete Apparate gebraucht, durch welche während der Gärung ein Strom von reinem Stickstoff unterhalten wurde.

Erster Versuch. Zwei Apparate zu einem System verbunden, das an einem Ende mit dem Stickstoffapparate kommunizierte, am anderen mit einer Schwefelsäure enthaltenden Waschflasche verschlossen war. Die Nährlösung enthielt nur Dextrose, Nährsalze, einen Ueberschuß von Kreide, und deckte den flachen Boden der Gefäße mit einer $1\frac{1}{2}$ cm dicken Schicht. Alle verwendeten Substanzen — Dextrose, Wasser, Salze — wurden sorgfältig gereinigt und enthielten keine durch die Analyse nachweisbaren Spuren von Stickstoff.

Gesamtmenge der nach Soxhlet bereiteten Dextrose 40,0 gr
 „ der Salzlösung 1000 ccm

Aussaat von reinen Clostridium Pastorianum-Sporen am 23. Nov. und sofortige Verdrängung der Luft durch Stickstoff. Gegen den 1. Dez. stürmische Gärung, die am 13. Dez. nicht mehr bemerkbar ist. Es wurde sofort zur Analyse geschritten. Die Fehling'sche Probe ergab keinen Zucker mehr. Zur Bestimmung des assimilierten Stickstoffes wurde der ganze Bodensatz abfiltriert, getrocknet und nach Dumas verbrannt. Zu demselben Zwecke wurde die Hälfte des Filtrates unter vermindertem Druck in einem Kjeldahl'schen Kolben verdampft und nach Kjeldahl analysiert. Es wurde gefunden:

im Bodensatz 42,3 mg N
 im Filtrat 11,3 „ „

Gesamtgewinn 53,6 mg N

Die Destillation ergab nur sehr geringe Menge von Alkoholen. Nach wiederholter Umdestillation und Aussalzen wurde nur etwa $\frac{1}{3}$ ccm einer öligen, nach Fusel riechenden Flüssigkeit erhalten, deren Siedepunkt bei 108° lag, also wahrscheinlich aus Isobutylalkohol bestand.

Die Bestimmung des gelösten Kalkes (Gesamtacidität) und das Fraktionieren der flüchtigen Säuren nach Duclaux ergab die Anwesenheit von nur zwei flüchtigen Säuren, der Buttersäure und Essigsäure, und erlaubte, ihr Molekularverhältnis und ihre absolute Mengen zu bestimmen.

Molekularverhältnis der Buttersäure zur Essigsäure $\frac{b}{a} = 2,6$

Gesamtmenge der Essigsäure 3,714 g

„ „ Buttersäure 14,164 „

„ „ flüchtigen Säuren 17,878 „

beträgt also 44,7 Proz. des vergärten Zuckers.

Durch Abdestillieren der Buttersäure und Bereitung des Kalksalzes wurde konstatiert, daß die Säure zur normalen Reihe ge-

hörte. Von nichtflüchtigen Säuren wurden nur minimale Spuren Milchsäure gefunden.

Dieser Versuch schien mir insofern erwähnenswert, als er in jeder Hinsicht typisch für *Clostridium Pastorianum* ist. Sowohl seine intensive Gärfähigkeit dem Zucker gegenüber, zumal in stickstofffreien Medium, als seine Fähigkeit, dabei gasförmigen Stickstoff zu assimilieren, sind hier zur vollen Geltung gekommen. Daß auch der Gärungsvorgang hier typisch verlief, werden die nächsten zu citierenden Versuche bestätigen.

Zweiter Versuch. Dieselbe Nährflüssigkeit, aber mit einer geringen Menge von Ammon versetzt. Keine Reinkultur, sondern ein Gemisch von *Clostridium Pastorianum* mit aëroben Arten. Freier Luftzutritt. Dasselbe Kulturgefäß, nur wird von Zeit zu Zeit durch Schwefelsäure und Natron gereinigte Luft durchgeleitet. Das Gefäß wird beschickt mit

Dextrose nach Soxhlet	20,00 gr
Kreide, gereinigte	15,00 „
Ammonsulfat	0,010 „
Nährsalzlösung	1 l

Nach beendigter Gärung wird die Analyse ganz wie früher gemacht. Keine Spur von Zucker mehr.

Stickstoffgewinn (nach Abzug der initialen Menge) 24,4 mgr.

Die Bestimmung der Alkohole ergab etwa $\frac{1}{2}$ ccm einer bei 97,4° siedender Flüssigkeit (Propylalkohol). Die Bestimmung der molekulären Verhältnisse und der Mengen der flüchtigen Säuren nach Duclaux ergab:

$$\text{Verhältnis } \frac{b}{a} = 4,0$$

Essigsäure	1,313 g
Buttersäure	7,705 „
Zusammen	9,018 „ oder 45 Proz. der angewandten Zuckermenge.

Keine andere flüchtige Säure. Buttersäure normal. Von nichtflüchtigen Säuren geringe Spuren von Milchsäure.

Wie man sieht, ist der Charakter des Gärvorganges dem Wesen nach derselbe geblieben, obgleich die Bedingungen doch nicht unwesentlich verschieden waren.

Unter gewöhnlichen anaërobiotischen Verhältnissen haben wir im Gärungskolben zu verschiedenen Zeiten und mit verschiedenem Material eine Reihe von Versuchen ausgeführt, wobei wir als Stickstoffnahrung sowohl Ammoniak als Asparagin und Pepton gebrauchten.

(Schluß folgt.)

Nachdruck verboten.

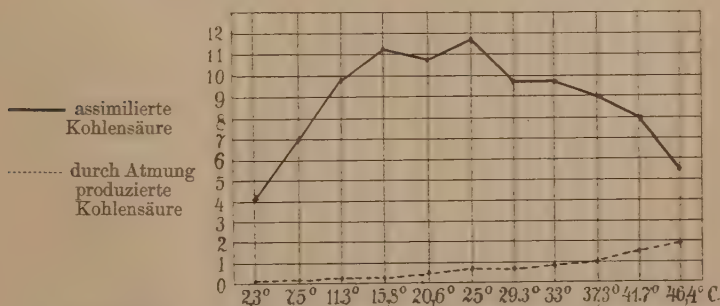
Ueber die Abhängigkeit der Assimilationsthätigkeit der Hefe von verschiedenen äusseren Einflüssen.

Von Prof. Dr. Th. Bokorny in München.

Die Assimilationsleistung der Pflanzen ist in ihren äußeren Bedingungen noch ziemlich wenig erforscht.

Unter den äußeren Bedingungen sind hier die Temperatur, der Wassergehalt des Substrates, fremde, nicht in den Stoffwechsel zu reißende chemische Substanzen (neutrale oder giftige) verstanden.

Bezüglich des Temperatureinflusses auf die Kohlensäureassimilation der grünen Pflanzen hebt Pfeffer in seiner Pflanzenphysiologie. 2. Auflage. Bd. I., p. 321 hervor, daß die meisten hierüber vorhandenen Untersuchungen kein verlässiges Bild über das Ausmaß der Assimilationsleistung geben, weil der gleichzeitige Verbrauch durch die Atmung nicht berücksichtigt ist, welcher letztere bis zum Tötungspunkt steigt. Nur die von Kreusler in den landwirtschaftlichen Jahrbüchern. 1887, 1888, 1890 publizierten Arbeiten ziehen auch die Atmung in Rechnung. Nimmt man den durch die Atmung wieder ausgeschiedenen Kohlenstoff hinzu, so zeigt sich, daß ein beblätterter Zweig von *Rubus fruticosus* in einer 0,3 Proz. Kohlensäure enthaltenen Luft bei elektrischem Lichte, das ungefähr mit hellem, diffusum Tageslicht gleich war, zwischen 15 und 25° am stärksten assimiliert, wie folgende Zeichnung angiebt:



Assimilations- und Atmungskurve für einen beblätterten Zweig von *Rubus fruticosus* nach Kreusler.

Während die Atmungskurve allmählich und ziemlich gleichmäßig ansteigt von 2,3 bis 46,4° C, zeigt die Assimilationskurve rasches Ansteigen bis 15,8°, dann geringe Senkung, hierauf Ansteigen zum Optimum bei 25°, das aber nicht viel über die Assimilationsgröße

bei 15,8° hinausgeht. Von 25° an sinkt die Assimilationsgröße stetig, von 41,7° bis 46,4° besonders rasch.

„Natürlich bietet die Kurve spezifische Verschiedenheiten, und es ist klar, daß Algen, die ihren ganzen Lebenslauf unter 0° abwickeln, auch bei dieser Temperatur gut assimilieren. Doch scheint allgemein der aktive Chlorophyllapparat beim Abkühlen auf 0° oder einige Grade unter 0 zunächst noch Kohlensäure zu zersetzen; Iumelle konnte sogar für einige Coniferen und Flechten eine schwache Kohlensäureassimilation bei 30—1,0° unter 0 nachweisen, während er keine Atmungsthätigkeit fand. Doch dürfte diese bei mäßigen Kältegraden länger anhalten als die Assimilation, die ohne Frage unter solchen Bedingungen, auch in den von Iumelle benutzten Pflanzen, mit der Zeit ausklingt.“

Um den Einfluß der Temperatur auf die Assimilationsthätigkeit der Hefe zu beobachten, wurden von mir folgende Versuche aufgestellt:

I.

Destilliertes Wasser	1 Liter		
Rohrzucker	50 g, d. i.	5	Proz.
PO ₄ KH ₂	1	„	0,1 „
Bittersalz	1	„	0,1 „
Ammonsulfat	5	„	0,5 „
Hefe von 31 Proz. Tr.S.	1	„	
Versuchszeit 2 Tage. — Temperatur 20° C.			

II.

Destilliertes Wasser	1 Liter		
Rohrzucker	50 g, d. i.	5	Proz.
PO ₄ KH ₂	1	„	0,1 „
Bittersalz	1	„	0,1 „
Ammonsulfat	5	„	0,5 „
Hefe von 31 Proz. Tr.S.	1	„	
Versuchszeit 2 Tage. — Temperatur 5° C.			

III.

Wasser	1 Liter		
Rohrzucker	50 g, d. i.	5	Proz.
PO ₄ KH ₂	1	„	0,1 „
Bittersalz	1	„	0,1 „
Ammonsulfat	5	„	0,5 „
Hefe von 31 Proz. Tr.S.	1	„	
Versuchszeit 2 Tage. — Temperatur 35°.			

Die Trockensubstanzbestimmung an der erhaltenen gewaschenen und bis zur Gew. Konstanz getrockneten Hefe ergab bei I) eine Vermehrung von 0,31 auf 0,51 g, also um 64 Proz.; bei II) eine Verminderung von 0,31 auf 0,24 g, also um 22,6 Proz.; bei III) eine Vermehrung von 0,31 auf 0,42 g, also um 39 Proz.

Daraus folgt, daß mittlere Temperatur für die Assimilationsthätigkeit am günstigsten ist, 35° ist schon zu warm, 5° ist zu

kalt. Bei letzterer Temperatur scheint die Hefe gar nicht zu assimilieren, der Verlust ist wohl auf einen Verbrauch von Trockensubstanz durch die Atmungsthätigkeit zurückzuführen (Gärungsschwach).

Da die Nährflüssigkeiten I und II infolge der ziemlich großen Zuckermengen beständig während der 2 Tage in Gärung waren, so war die Sauerstoffatmung höchstens anfangs möglich, solange der Sauerstoff nicht ganz verdrängt war; später lieferte die Gärung allein die zur Assimilation und zu anderen Lebensvorgängen nötige Betriebsenergie; eine Veratmung von Hefetrockensubstanz konnte nicht mehr stattfinden.

Faktisch zeigen nun die wenigen angestellten Versuche eine gewisse Uebereinstimmung mit den von Kreusler bei grünen Pflanzen erhaltenen Resultaten. Die Temperatur 20° ist wesentlich günstiger als 35°.

5° C ist bei Hefe noch weit ungünstiger als bei *Rubus fruticosus*. Denn die Hefe zeigt bei dieser Temperatur gar keine Assimilation mehr, wenigstens nicht in dem angegebenen Nährsubstrat. Möglich daß Peptonnahrung statt Ammonsulfat noch eine schwache Trockensubstanzvermehrung hervorbringen würde.

Um den Verbrauch von Zellsubstanz (Trockensubstanz) durch Atmung auszuschließen, hat Verf. auch in allen folgenden Versuchen, wie schon oben, Hefe angewandt, der reichliche Zuckermengen zur Vergärung dargeboten waren. So konnten alle Assimilationsprodukte für die lebende Zelle selbst erhalten bleiben.

Hinsichtlich des Wassergehaltes des Substrates und seiner Wirkung auf die assimilierende Zelle schreibt Pfeffer (a. a. O. Bd. I. p. 322), daß wohl in manchen Pflanzen durch fortdauernde Plasmolyse eine Inaktivierung der Chloroplasten bewirkt werde und vielleicht deswegen bei einigen Studien (Meissner, Weyl) in den plasmolysierten Pflanzen Assimilationsthätigkeit vermißt wird.

Verfasser selbst hat einige Versuche mit Hefe angestellt, wodurch die Schädlichkeit zu hoher Konzentration für die Assimilationsthätigkeit an einem der besten Nährstoffe, nämlich Zucker (und Pepton), dargethan wird. Die Assimilationsgröße wurde an der Trockensubstanzvermehrung erkannt.

Da die Versuche so angestellt wurden, daß eine normale, d. i. Sauerstoffatmung nicht stattfinden konnte und der Gärungsvorgang die nötige Energie für die Assimilationsleistung liefern mußte, so ist es natürlich von Wichtigkeit, daß nicht auch dieser durch die gebotenen Bedingungen gestört wurde. Wie wir sehen werden, hat die hohe Konzentration (20 Proz. Zucker) jene Gärthätigkeit in gewiß ausreichendem Maße gestattet.

Es wurden zugleich bei mehreren Versuchen einige für die Ernährung nötige fremde Stoffe in ganz geringer Menge zugesetzt, um durch den Vergleich mit dem Normalversuch zu sehen, ob durch dieselben etwas an der Assimilationsthätigkeit geändert werde.

Zu jedem Versuch wurde 1 g frische Preßhefe verwendet, deren Trockensubstanz durch ein Paar Bestimmungen zu 33 Proz. gefunden wurde.

Die Versuchszeit war 48 Stunden, innerhalb welcher ausgiebige Gärung und Assimilation eintreten konnte.

Die Temperatur betrug 25°; bei derselben ernährt und vermehrt sich die Hefe sonst vorzüglich.

Versuch A.

Destilliertes Wasser	100	g
Rohrzucker	20	" also 20 Proz.
Pepton (Fleisch-)	0,5	"
Monokaliphosphat	0,2	"
Magnesiumsulfat (Bittersalz)	0,1	"
Preßhefe	1	"

Versuch B.

Destilliertes Wasser	100	g
Rohrzucker	5	" also nur 5 Proz.
Pepton (Fleisch-)	0,5	"
Monokaliphosphat	0,2	"
Magnesiumsulfat (Bittersalz)	0,1	"
Preßhefe	1	"

Versuch C.

Destilliertes Wasser	100	g
Rohrzucker	20	" d. i. 20 Proz.
Pepton (Fleisch-)	0,5	"
Monokaliphosphat	0,2	"
Magnesiumsulfat	0,2	"
freie Schwefelsäure	0,01	"
Preßhefe	1	"

Versuch D.

Destilliertes Wasser	100	g
Rohrzucker	20	" d. i. 20 Proz.
Pepton aus Fleisch	0,5	"
Monokaliphosphat	0,2	"
Magnesiumsulfat	0,1	"
Freie Phosphorsäure	0,01	" d. i. 0,01 Proz.
Preßhefe	1	"

Versuch E.

Destilliertes Wasser	100	g
Rohrzucker	20	" d. i. 20 Proz.
Pepton aus Fleisch	0,5	"
Monokaliphosphat	0,2	"
Magnesiumsulfat	0,1	"
Freie Flußsäure	0,01	" d. i. 0,01 Proz.
Preßhefe	1	"

Versuch F.

Destilliertes Wasser	100	g	
Rohrzucker	20	"	d. i. 20 Proz.
Pepton aus Fleisch	0,5	"	
Monokaliphosphat	0,2	"	
Magnesiumsulfat	0,1	"	
Freie Milchsäure	0,02	"	d. i. 0,02 Proz.
Preßhefe	1	"	

Versuch G.

Destilliertes Wasser	100	g	
Rohrzucker	20	"	d. i. 20 Proz.
Pepton aus Fleisch	0,5	"	
Monokaliphosphat	0,2	"	
Magnesiumsulfat	0,1	"	
Formaldehyd	0,1	"	d. i. 0,1 Proz.
Preßhefe	1	"	

Versuch H.

Destilliertes Wasser	100	g	
Rohrzucker	20	"	d. i. 20 Proz.
Pepton aus Fleisch	0,5	"	
Monokaliphosphat	0,2	"	
Magnesiumsulfat	0,1	"	
Formaldehyd	0,01	"	d. i. 0,01 Proz.
Preßhefe	1	"	

Versuch I.

Destilliertes Wasser	100	g	
Rohrzucker	20	"	d. i. 20 Proz.
Pepton aus Fleisch	0,5	"	
Monokaliphosphat	0,2	"	
Magnesiumsulfat	0,1	"	
Caffein	0,1	"	d. i. 0,1 Proz.
Preßhefe	1	"	

Versuch K.

Destilliertes Wasser	100	g	
Rohrzucker	20	"	d. i. 20 Proz.
Pepton aus Fleisch	0,5	"	
Monokaliphosphat	0,2	"	
Magnesiumsulfat	0,1	"	
Chlornatrium	0,1	"	
Preßhefe	1	"	

Versuch L.

Destilliertes Wasser	100	g	
Rohrzucker	20	"	d. i. 20 Proz.
Pepton aus Fleisch	0,5	"	
Monokaliphosphat	0,2	"	
Magnesiumsulfat	0,1	"	

Calciumchlorid 0,1 g d. i. 0,1 Proz.
 Preßhefe 1 "

Bei allen Versuchen wurde nach 2tägiger Versuchsdauer die entstandene Hefe auf einem Filter gesammelt und ausgewaschen, dann bis zur Gewichtskonstanz getrocknet bei 100°.

Die Trockensubstanz-Bestimmung ergab bei Versuch

A)	0,40 g	nach 48-st. Ernährung		
B)	0,65	" "	" "	" "
C)	0,49	" "	" "	" "
D)	0,45	" "	" "	" "
E)	0,15	" "	" "	" "
F)	0,25	" "	" "	" "
G)	0,18	" "	" "	" "
H)	0,30	" "	" "	" "
I)	0,12	" "	" "	" "
K)	0,30	" "	" "	" "
L)	0,32	" "	" "	" "

Die Trockensubstanz der angewandten Hefe betrug 0,33 g.

Es hatte also in wenigen Fällen eine nennenswerte Trockensubstanzvermehrung stattgefunden. Bei Versuch B), wo die Gesamtkonzentration nur 5,8 Proz. betrug, hat sich die Trockensubstanz von 0,33 auf 0,65 g vermehrt (binnen 2 Tagen); sonst war eine Zunahme bei A) von 0,33 auf 0,40, C) von 0,33 auf 0,49, D) von 0,33 auf 0,45 zu bemerken. Außerdem überall Abnahme der Trockensubstanz oder kaum Gleichbleiben. Am stärksten sank die Trockensubstanz bei Versuch E), wo freie Flußsäure in ganz geringer Menge (0,01 Proz.) zugesetzt war, und im Versuch I) mit 0,1 Proz. Caffein-Zusatz.

Daß mangelnde Gärthätigkeit an dem ungünstigen Resultat schuld sei, kann nicht angenommen werden, denn fast überall trat kräftige Gärung ein und gerade bei dem Caffeinversuch mit dem allerschwächsten Ausfall der Trockensubstanzbestimmung war der Gärungsverlauf ein sehr schöner; sehr bald trat lebhaftige Gärung ein, die während der ganzen Versuchsdauer anhielt und nach 48 Stunden noch in lebhaftem Gange war. In dem Formaldehydversuch G), der nur 0,18 g Tr. S. lieferte, hörte die Gärung etwas früher auf, wie bei den anderen Versuchen, war aber während des ersten Tages kräftig. In dem Flußsäureversuch E) war die Gärung auch ziemlich erheblich, wenn auch schwächer als bei den übrigen.

Es bleibt also nur übrig, die hohe Konzentration und in einigen Fällen die Giftigkeit der zugesetzten fremden Substanz [Caffein 0,1 Proz. bei I), Flußsäure 0,01 Proz. bei E), Formaldehyd 0,1 Proz. bei G)] als die Ursache des Assimilationsmangels anzusehen. Starben die Hefenzellen bald ab, wie es bei Einwirkung letztgenannter Substanzen der Fall war, so mußte natürlich durch Austritt von Trockensubstanz aus den nun durchlässig gewordenen Zellen eine Verminderung des Trockengewichtes zustande kommen, die selbstverständlich um so bedeutender war, je früher der Tod der Hefe eintrat.

Die Versuche ohne Zusatz giftiger Stoffe, wie Versuch A, K und L, zeigten keine oder nur eine ziemlich geringe Zunahme der Trockensubstanz. A hatte keinen besonderen Zusatz, K einen Zusatz von 0,1 Proz. Chlornatrium, L einen solchen von 0,1 Proz. Chlorcalcium erhalten. Da bei A die Trockensubstanz wenigstens von 0,33 auf 0,40 stieg, während sie bei K und L von 0,33 zurückging auf 0,30 bezw. 0,32 g, so weist der Zusatz dieser Chloride keinerlei Vorteil, eher einen kleinen Nachteil auf.

Formaldehydzusatz (Versuch G und H) tötet bei 0,1 Proz.; bringt aber keinen sehr erheblichen Schaden bei 0,01 Proz. hervor. Die Hefezelle hält sich fast auf derselben Trockensubstanz, welche ursprünglich vorhanden war, wenn 0,01 Proz. Formaldehyd zur Nährlösung zugesetzt wird. Eine Assimilation tritt freilich nicht ein.

Vorteilhaft zeigt sich ein Zusatz von 0,01 Proz. freier Phosphorsäure, da hier die Trockensubstanz von 0,33 auf 0,45 steigt, also höher, wie bei einem sonst gleichen Versuch ohne freie Phosphorsäure.

Ebenso wirkt 0,01 Proz. Schwefelsäure günstig.

Wir werden später sehen, daß diese Säuren bei 10-fach stärkerer Konzentration einen entschieden nachteiligen Einfluß üben. Jene günstige Wirkung sehr geringer Säuremengen ist wohl als eine Art Reizwirkung aufzufassen.

Bezüglich der Konzentration der Nährlösung geht aus den oben aufgeführten Versuchen hervor, daß 20 Proz. zu konzentriert ist; das Assimilationsplasma arbeitet bei solcher Konzentration der Nährlösung nicht so energisch, wie bei etwa 5 Proz.

Darum wurde bei den folgenden Versuchen immer eine geringere Konzentration des Nähr- und Gärsubstrates gewählt.

Im Folgenden soll zunächst der Einfluß einiger freien Säuren auf die Assimilationsthätigkeit der Hefe durch Versuche erläutert werden. Denn die Säuren sind bei der Praxis der Gärungsindustrie nicht ausgeschlossen.

Bemerkt sei zunächst im allgemeinen, daß freie Säure sich sonst immer als lebensfeindlich erwiesen hat. So tötet schon 0,02 Proz. freie Schwefelsäure die Algen und Infusorien binnen 24 Stunden ab, ebenso 0,02 Proz. freie Salzsäure.

Auch organische Säuren sind lebensfeindlich; denn in 0,05 Proz. Apfel- oder Weinsäure sterben *Sphaeroplea* und *Spirogyra* binnen 24 Stunden ab.

Auch die Kohlensäure wird demnach schädlich wirken, die bei der Gärung selbst sich bildet, natürlich nach Maßgabe ihrer geringen Acidität und Löslichkeit.

Versuch 1.

Wasser (destilliertes)	100	g
Rohrzucker	5	"
Fleischpepton	0,5	"
Monokaliphosphat	0,2	"
Bittersalz	0,1	"
Freie Phosphorsäure (H_4PO_3)	0,1	"
Hefe von 30 Proz. Trockensubstanz	1	"

Nach 48-stündigem Stehen bei 20—25° hatte sich die Flüssigkeit geklärt (nach nur 24 Stunden noch nicht); starker Bodensatz war entstanden; Gärung war nicht mehr sichtbar, der Geschmack der Flüssigkeit kaum mehr süß. Unter dem Mikroskop erwies sich der Niederschlag als reine, kräftig sprossende, bakterienfreie Bierhefe, welche zu großen Sproßverbänden vereinigt war. Nun wurde filtriert, gewaschen, getrocknet.

Die Trockensubstanz-Bestimmung des gewaschenen und vorsichtig bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Niederschlages ergab 0,48 g. Es war also eine Vermehrung der Trockensubstanz von 0,30 auf 0,48, d. i. von 60 Proz., eingetreten.

Da bei einem Kontrollversuch ohne Säurezusatz die Trockensubstanz von 0,30 auf 0,60 g vermehrt wurde, so zeigt sich hier deutlich ein hemmender Einfluß der Säure trotz der großen Verdünnung. Immerhin aber blieb die Hefe gesund und sproßte weiter, als die filtrierte Flüssigkeit mit einer Spur jener Hefe versetzt und noch einige Tage stehen gelassen wurde. Allmählich kam neben *S. cerevisiae* eine langgestreckte Hefenart (*S. mycoderma*, auf.

Versuch 2.

Aqua destillata	100	g
Rohrzucker	5	"
Fleischpepton	0,5	"
Monokaliphosphat	0,2	"
Bittersalz	0,1	"
Freie Phosphorsäure (H_3PO_4)	0,25	"
Hefe von 30 Proz. Trockensubstanz	1	"

Nach 48 Stunden war die Flüssigkeit klar (nach 24 noch nicht); Geschmack kaum mehr süß, Gärung nicht mehr im Gange. Unter dem Mikroskop zeigte sich bakterienfreie sprossende Hefe, welche aber keine größeren Sproßverbände bildete.

Makroskopisch stellte sich die Hefe teils als Bodensatz, teils als Haut auf der Flüssigkeit, die einen angenehmen Gärungsgeruch aufwies, dar. Keine Bakterien waren vorhanden, kein *S. mycoderma* war gewachsen; die Hefe erwies sich als rein.

Die Trockensubstanz der gewachsenen Hefe betrug 0,39 g. Also war gegenüber der ursprünglichen Hefe eine Trockensubstanzvermehrung von 0,30 auf 0,39, d. i. um 30 Proz., eingetreten.

0,25 Proz. bewirkt also eine noch wesentlich stärkere Hemmung der Assimilation als 0,1 Proz.

Versuch 3.

Destilliertes Wasser	100	g
Rohrzucker	5	"
Fleischpepton	0,5	"
Monokaliphosphat	0,2	"
Bittersalz	0,1	"
Freie Phosphorsäure (H_3PO_4)	0,5	"
Hefe von 30,0 Proz. Trockensubstanz	1	"

(Fortsetzung folgt.)

Nachdruck verboten.

Kleinere Mittheilungen über Nitrifikationsmikroben.

[Aus dem Laboratorium von Prof. Dr. S. Winogradsky im Kaiserl. Institut für experimentelle Medizin in St. Petersburg.]

Von **W. Omelianski.**

II.

Wird schweflige und phosphorige Säure durch *Nitrobacter oxydiert*?

Die Feststellung genauer Grenzen der Reaktionsfähigkeit der Mikroben, insbesondere solcher, die eine so hervorragende Stellung unter den übrigen Agentien des Erdbodenstoffwechsels einnehmen, wie die Gruppe der Nitrifikationsmikroben, kann nicht bei der Erforschung derselben umgegangen werden. In einer unserer früheren Mittheilungen¹⁾ haben wir bereits *Nitrosomonas* in dieser Hinsicht einer Untersuchung unterworfen und festgestellt, daß ihre Wirkung auf die Oxydation von Ammoniakstickstoff streng beschränkt ist. Selbst Verbindungen, die dem Ammoniak chemisch so nahe stehen, wie die Amine, insbesondere die primären, vermögen das Ammoniak nicht zu ersetzen; dieselben werden von den Mikroben nicht oxydiert und sind daher zur Erhaltung der Lebensthätigkeit derselben untauglich.

Es schien uns interessant, auch den Nitratbildner in dieser Hinsicht zu prüfen. Die Frage, ob seine Thätigkeit sich auf die Oxydation der salpetrigen Säure zu Salpetersäure beschränkt, oder sich auch auf andere unvollständig oxydierte mineralische Salze erstreckt, drängte sich von selbst auf und war gewiß einer Untersuchung wert. Wir wählten zu diesen Versuchen die Natronsalze der schwefligen und der phosphorigen Säure.

Wie die Untersuchungen von Prof. Winogradsky ergeben haben, wachsen die Nitrifikationsmikroben am besten auf rein mineralischem Nährboden, welcher die gewöhnlichen Nährsalze, kohlensaures Alkali oder Erdalkali enthält, aber die Hauptbedingung für ihr Wachstum ist die Anwesenheit von Ammoniak für den Nitritbildner und von Nitrit für den Nitratbildner. Das Leben dieser Mikroben ist mit der Oxydation der genannten Körper eng verknüpft und bei Abwesenheit der letzteren läßt sich keine Spur von Wachstum wahrnehmen. Daher kann auch bei der Prüfung neuer oxydierbarer Stoffe die bloße Thatsache des Wachstumes der Nitrifikationsmikroben als sicheres Kennzeichen dienen, daß dieselben in stande sind, den zu untersuchenden Körper zu oxydieren und auf Kosten der dabei freiwerdenden Energie zu leben. Da es nun weiter bekannt ist, daß der Nitratbildner vorzüglich auf Nitrit-

1) Omelianski, W., Ueber die Nitrifikation des organischen Stickstoffes. (Centralbl. f. Bakt. etc. II. Abt. Bd. V. 1899. No. 13.)

agar gedeiht, so könnte man sich mit einer ganz einfachen Versuchsanordnung begnügen.

Wir bereiteten Agargallerte, welche das zu prüfende Salz (0,2 Proz.), sowie als Stickstoffquelle Spuren von KNO_2 , KNO_3 und Pepton enthielt. Zur Kontrolle dienten drei Proben der gleichen Gallerte, welche jedoch das zu prüfende Salz nicht enthielten. Das positive oder negative Resultat des Versuches wurde durch Vorhandensein oder Abwesenheit von Wachstum auf der schiefen Agarfläche bestimmt.

1. Versuch mit schwefligsaurem Natron.

Es wurden 6 Proben von Agargallerte von folgender Zusammensetzung angefertigt:

Na_2CO_3	=	0,1 Proz.	$\left\{ \begin{array}{l} \text{a) } \text{Na}_2\text{SO}_3 = 0,2 \text{ Proz.} \\ \text{b) ohne Zus. v. } \text{Na}_2\text{SO}_3 \end{array} \right. \left\{ \begin{array}{l} 1) \text{ KNO}_2 = 0,03 \text{ Proz.} \\ 2) \text{ KNO}_3 = 0,03 \text{ „} \\ 3) \text{ Pepton} = 0,03 \text{ „} \\ 4) \text{ KNO}_2 = 0,03 \text{ „} \\ 5) \text{ KNO}_3 = 0,03 \text{ „} \\ 6) \text{ Pepton} = 0,03 \text{ „} \end{array} \right.$
K_2HPO_4	=	Spuren	
Agaragar	=	1,5 Proz.	
Leitungswasser	=	1000 „	

Am 13. September 1901 wurden mit einer Kultur des Nitratbildners (Aufschwemmung von 3 Strichen einer Agarkultur in 10 ccm Wasser) in gleicher Weise je 2 Röhrchen mit schräg erstarrtem Agar von jeder der genannten 6 Muster oberflächlich geimpft. Die Röhrchen wurden im Thermostaten bei $35^\circ 3\frac{1}{2}$ Wochen lang gehalten. Am 7. Oktober unterbrachen wir den Versuch. Es erwies sich, daß nur in den Röhrchen, denen Kalinitrit zugesetzt war (Proben 1 und 4), Wachstum eingetreten war, und zwar ein gleich gutes in beiden verschiedenen Reihen. Der letztere Umstand läßt erkennen, daß das zum Versuche genommene Natriumsulfit keinerlei schädigende Wirkung auf den Mikroorganismus ausgeübt hatte, doch erwies sich dieses Salz zugleich als Material zur Oxydation als für denselben gänzlich unbrauchbar. In den Proben mit Kalinitrat und Pepton wurde überhaupt kein Wachstum wahrgenommen.

2. Versuch mit phosphorigsaurem Natron.

Die Anordnung des Versuches und die Zusammensetzung der 6 Gallerteproben waren genau dieselben wie im vorigen Versuche, mit dem einzigen Unterschiede, daß anstatt 0,2 Proz. Natriumsulfit hier 0,2 Proz. Natriumphosphit in Anwendung kam. Die Impfung aller 12 Röhrchen erfolgte am 20. September 1901. Die Gläser wurden bis zum 7. Oktober, d. h. $2\frac{1}{2}$ Wochen, im Brutschranke bei 35° gehalten. Das erhaltene Resultat war dem des vorigen Versuches vollkommen gleich, d. h. ein Wachstum wurde nur auf denjenigen Gallerteproben wahrgenommen, welche Kalinitrit enthielten, und war auch hier in den beiden Reihen ein gleich gutes, in allen übrigen war dagegen keine Spur von Entwicklung zu bemerken.

Wir gelangen demnach auf Grund dieser Versuche, sowie der schon früher für *Nitrosomonas* erhaltenen Resultate zu dem

Schlusse, daß die Reaktionsfähigkeit der Nitrifikationsmikroben sich strikt auf die Oxydation von Ammoniak zu salpetriger Säure einerseits (*Nitrosomonas*) und von salpetriger Säure zu Salpetersäure andererseits (*Nitrobacter*) beschränkt und sich nicht auf andere unvollkommen oxydierte mineralische Verbindungen erstreckt.

Referate.

Jwanoff, Ueber die Zusammensetzung der Eiweißstoffe und Zellmembranen bei Bakterien und Pilzen. [Aus dem pharmakol. Laborat. der militärmediz. Akademie zu Petersburg.] (Hofmeister's Beiträge zur chemisch. Physiologie und Pathologie. Bd. I. 1902. Heft 10—12. p. 524—537.)

Jwanoff stellte in einer Reihe von Pilzen und Bakterien die Anwesenheit von Nukleoproteiden fest. In den Zellmembranen wurde Chitin nachgewiesen. Dieses Chitin scheint dem tierischen ähnlich zu sein, aus ihm konnte Chitosamin isoliert werden.

Martin Jacoby (Heidelberg).

Brandt, K., Ueber den Stoffwechsel im Meere. 2. Abhandlung. (Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen, herausgegeben von der Kommission zur Untersuchung der deutschen Meere in Kiel und der Biologischen Anstalt auf Helgoland. Abteilung Kiel. Neue Folge. Bd. VI. p. 23—79. Kiel 1902.)

Verf. hat in einer früheren Abhandlung (1899) die interessante Theorie aufgestellt, dass der Reichtum der verschiedenen Meeresgebiete an Organismen nach Liebig's Minimumgesetz von der Quantität der gelösten Stickstoffverbindungen abhängig sei. Diese Verbindungen werden zwar immer vom Lande aus in beträchtlichen Quantitäten in das Meer herausgeführt werden, aber wahrscheinlich von den Meeresbakterien umgesetzt, so daß schließlich wieder freier Stickstoff entsteht.

Diese Theorie begründet Verf. in der vorliegenden Abhandlung ausführlich; neue, von Baur auf Veranlassung des Verf.'s ausgeführte Untersuchungen über nitrifizierende und denitrifizierende Bakterien im Meere, werden mitgeteilt und diskutiert, und zuletzt spricht Verf. darüber, wie die Theorie näher geprüft werden kann.

Während die Landvegetation in den tropischen Gebieten, wenigstens überall, wo die Feuchtigkeit genügend ist, außerordentlich viel reicher ist, als in den temperierten und arktischen Ländern, besteht im Meere kein solcher Unterschied. Zwar findet sich in den wärmeren Meeren eine viel größere Anzahl von Arten

als in den kälteren; der Reichtum an Individuen ist aber nicht wesentlich größer, insoweit bis jetzt vergleichbare Beobachtungen vorhanden sind. Die größten Fischereien finden nicht in den Tropen statt, sondern in den kälteren Meeren, besonders in den Gebieten, wo temperierte Strömungen sich mit den eiskalten Wassermengen der Polarmeere begegnen. Da findet sich auch die größte Menge von Seevögeln und größeren Seetieren (Seehunden, Walen), und die größten Meeresalgen gehören nicht den Tropen, sondern den südlichen (*Macrocystis*) und nördlichen (*Laminarien*) Meeren an. Für die Verteilung der kleineren Planktonorganismen gilt dasselbe Gesetz; die verschiedenen Expeditionen, die die Polarmeere besuchten, sprechen einstimmig über den großen Planktonreichtum (besonders an Diatomeen) der kälteren Meeresgebiete im Gegensatz zu den wärmeren. So groß ist der Unterschied doch nicht, wie er diesen Forschungsreisenden vorgekommen ist; sie haben ihre Untersuchungen während des Sommers gemacht, zu welcher Zeit das arktische und subarktische (bez. antarktische) Plankton ein überaus reiches, aber kurzes Aufblühen hat. Den langen Winter hindurch sind die Polarmeere sehr arm an Planktonorganismen; für die Vergleichung ist es also notwendig, zusammenhängende Beobachtungen durch ein ganzes Jahr zu haben. Solche Beobachtungsreihen sind aber schon von verschiedenen Küstengebieten vorhanden; die Proben sind mit Hensen's quantitativem Vertikalnetz geschöpft und die Quantität durch Volummessung bestimmt. Verf. stellt Beobachtungsreihen zusammen von 1) Karajak in Nordwest-Grönland (Vanhöffen), 2) Kieler Bucht (Verf. und Apstein), 3) Neapel (Schütt und Apstein), 4) Straße von Messina (Lohmann), 5) Syrakus (Lohmann), 6) Ralun in Neupommern (Dahl); aus der Zusammenstellung geht hervor, dass die Karajakfjord wenigstens ebenso reich ist als die temperierten Gebiete und entschieden reicher als die tropischen.

Nach der Theorie des Verf.'s ist der relative Reichtum der kühleren Meere dadurch bedingt, daß die Stickstoffverbindungen bei hoher Temperatur schnell von Bakterien gestört werden, während sie in den kälteren Meeren besser von den kohlenensäureassimilierenden Organismen ausgenutzt werden können (Diatomeen, Peridineen, Flagellaten). Die organischen Stickstoffverbindungen sollten dann von den Bakterien zuerst bis zu Ammoniak gespalten werden, dann nitrifiziert und endlich durch denitrifizierende Arten als freier Stickstoff entbunden werden. Diese Theorie wird durch die folgenden Thatsachen gestützt:

1) Nitrite sind an verschiedenen Stellen im Meere unter anderem durch Natterer's Untersuchungen nachgewiesen.

2) Es ist dem Verf. gelungen, in Kulturen, die mit Bodenschlamm aus der Ostsee infiziert waren, Nitrifikation zu bekommen. Die Bakterien sind noch nicht reingezüchtet; sie können auch ohne Kochsalz leben; ebenso wie auch Nitrifikationsbakterien aus dem Lande mit dem Salzgehalt der Ostsee gut wachsen können. Darum hält Verf. es für möglich, daß die nitrifizierenden Bakterien der Ostsee identisch

sein können mit den von Winogradsky in der Ackererde gefundenen.

3) Baur hat zwei Arten von denitrifizierenden Bakterien aus der Ostsee isoliert und gefunden, daß solche Bakterien in der Ostsee regelmäßig vorkommen.

4) Die bis jetzt gefundenen Arten von denitrifizierenden Bakterien haben ein ziemlich hohes Temperaturoptimum; bei 25° geht die Denitrifikation viel (2—4mal) schneller als bei 15° vor sich, während sie bei 4—5° nur sehr langsam wachsen, bei 0° gar nicht.

Von anderen Nährstoffen, die möglich im Meere in minimalen Quantitäten vorhanden sein können, bespricht Verf. die Phosphorsäure und Kieselsäure, kommt aber zu dem Resultat, daß wenn auch diese Stoffe von Bedeutung sein können, es doch wahrscheinlich ist, daß der Gehalt an Stickstoffverbindungen entscheidend sein wird.

Damit diese außerordentlich interessante Theorie weiter geprüft werden kann, müssen folgende Untersuchungen gemacht werden: 1) Weitere Untersuchungen über die Biologie der Planktonorganismen, 2) Studien über die Verbreitung der gelösten Stickstoffverbindungen im Meere, 3) Untersuchungen über die Lebensbedingungen und die Verbreitung der marinen „Stickstoffbakterien“.

Um die letzteren aufzufinden, empfiehlt Verf. folgende Nährlösungen:

1) Für denitrifizierende Arten (Baur's Lösung): 1 kg frische Mießmuscheln werden in 1—2 l Seewasser gekocht und dem Filtrat 2 Proz. Pepton und 0,25 Proz. Calciumnitrit zugesetzt.

2) Für nitrifizierende Bakterien: Seewasser 500, destilliertes Wasser 500, Kaliumphosphat 1, Magnesiumphosphat 0,5, Chlorcalcium Spur. Diese Lösung wird in Kölbchen zu je 20 ccm gefüllt und sterilisiert. Nach dem Erkalten werden jedem Kölbchen 2 ccm steriler 2-proz. Lösung von Ammoniumsulfat zugesetzt sowie 2—3 ccm einer milchigen sterilisierten Aufschwemmung von Magnesiumkarbonat in Wasser.

Gran (Bergen).

Kulescha, G., Untersuchungen über die Bakterienflora der Heringslake. (Bericht des landwirtschaftlich-bakteriologischen Laboratoriums am Ministerium der Agrikultur zu St. Petersburg. 1899.)

Die Arbeit Kulescha's ist besonders von dem Standpunkt aus interessant, als sie die erste bakteriologische Untersuchung russischer gesalzener Heringe giebt und auf Grund der vorgefundenen Bakterienflora den Beweis liefert, daß dieses Produkt noch weit hinter den ausländischen Produkten steht. Das Material zu den genannten Untersuchungen gab die reiche Firma Ssaposchnikoff in Astrachan. Nachdem der Verf. in seinem Bericht darauf hingewiesen, daß die bakteriologischen Untersuchungen der Heringslake sich noch im ersten Entwicklungsstadium befinden, und kurz die Resultate der Wehmer'schen Untersuchungen berührt hat, giebt er eine Beschreibung der von

ihm isolierten Mikroben, von denen sich einige fast stets in sämtlichen untersuchten Proben vorfanden und gewiß eine Rolle bei der Reifung der Heringslake spielen dürften. Von den isolierten Mikroben waren besonders 10 Formen sehr verbreitet. Was die Beschreibung derselben anbetrifft, so muß auf das Original verwiesen werden. Vier der beschriebenen Arten, die der Verf. mit *Bacillus* No. 1, No. 2 und No. 4 und *Micrococcus* No. 9 bezeichnet, fanden sich in allen Gelatineplatten vor, die anderen 6 mehr oder weniger oft. Diese Mikroben, mit Ausnahme des *Bacillus* No. 4, der zur Gruppe der Fäulnisbakterien zu gehören scheint, hält der Verf. für gewöhnliche Bewohner der russischen Heringslake. Alle beschriebenen Mikroben, mit Ausnahme des *Bac.* No. 4, besaßen die Fähigkeit, sich in Nährsubstraten zu entwickeln, die bis zu 20 Proz. Kochsalz enthielten. Außer Mikrokokken und Bacillen fand Verf. nicht selten Hefearten, besonders *Saccharomyces cerevisiae* und Rosahefe, sowie Schimmelpilze. Diese Mikroorganismen sind jedoch nur als zufällige Verunreinigungen anzusehen. Unzweifelhaft stellt die Bakterienflora der Heringslake den Faktor dar, der die typischen chemischen Veränderungen in derselben verursacht. Der langsame Verlauf dieser Veränderungen ist dem schädlichen Einfluß des Salzes auf die Lebensfähigkeit der Bakterien zuzuschreiben.

Sonderbarerweise erstreckt sich die Entwicklung der Bakterien nicht auf das Fleisch der Heringe, welches vollkommen steril bleibt und nur rein chemischen Veränderungen unterworfen wird.

Auf Grund seiner Untersuchungen hält sich Verf. nicht für berechtigt, Schlüsse zu ziehen über die Rolle, die den einzelnen isolierten Mikroben zukommt, da zur Untersuchung ein bereits reifes Produkt vorlag. Der Umstand aber, daß einige von den isolierten Bakterien auf Nährboden einen unangenehmen Geruch verbreiteten, läßt annehmen, daß die Lebensprodukte dieser Mikroben den Fisch verschlechtern, so daß der Reichtum und die Vielartigkeit der Bakterienflora der Astrachan'schen Heringe als eine durchaus nicht wünschenswerte Erscheinung anzusehen ist, auf die man Acht geben muß.

Die Hauptresultate der Untersuchungen sind demnach folgende:

1) Die russische Heringslake enthält eine sehr reichhaltige Bakterienflora, viel reichhaltiger als die von Wehmer untersuchte Emdener Heringslake, was jedoch nicht zur Verbesserung, sondern eher zur Verschlechterung des genannten Produktes beiträgt.

2) Das Fleisch der Heringe ist vollkommen steril und enthält weder aërobe noch anaërobe Mikroben.

Grimm (Petersburg).

Barker, Sexual spore formation among the Saccharomycetes. (Ann. of Bot. 1901. Vol. XV. p. 759.)

Verf. rekapituliert seine Angaben und die Mitteilungen anderer Autoren über die Sexualität der Saccharomyceten. — Bei den

verschiedenen Hefen kommt diese in verschiedenem Maße zum Ausdruck. Bei *Zygosaccharomyces* kopulieren zwei Zellen miteinander, die nach der Befruchtung ihre Individualität beibehalten. Ähnlich verhält sich *Saccharomyces Pombe*. Bei *S. octosporus* kopulieren zwei Zellen, die durch Teilung aus der nämlichen Mutterzelle entstanden sind, meist vollständig miteinander und geben dabei ihre eigene Individualität völlig auf. In anderen Fällen wird die Sporenbildung ohne vorherige Teilung der ursprünglichen Mutterzelle erreicht. Dabei geht der Sporenbildung Kernteilung und Kernverschmelzung voraus, oder es sind auch diese Prozesse in Wegfall gekommen. In letztem Fall ist dann jede Andeutung sexueller Thätigkeit verschwunden. Küster (Halle a. S.)

Will, H., Einige Beobachtungen über die Lebensdauer getrockneter Hefe. VI. Nachtrag. [Mitteilungen der wissenschaftlichen Station für Brauerei in München.] (Zeitschr. ges. Brauerw. Bd. XXV. 1902. p. 49 u. 50.)

Bei der wiederholten Untersuchung der Holzkohlekonserve No. 10 und der Asbestkonserve¹⁾ nach 15 Jahren und 2 Monaten entwickelten sich noch immer Hefezellen, und zwar solche von wilden Arten. Bei der Holzkohlekonserve machte sich eine weitere Abnahme der lebens- und entwicklungsfähigen Zellen deutlich geltend. Die aus der Asbestkonserve entwickelte wilde Hefe gehörte der gleichen großzelligen Art an, welche schon bei der Untersuchung im Jahre 1900 den wesentlichsten Bestandteil der Hefeabsätze bildete.

Die Lebensdauer von wilder Hefe in trockenem Zustand ist also bei Ausschluß der dieselbe beeinträchtigenden Faktoren, wie höhere Temperatur, Zutritt der Luft, zu hoher Wassergehalt und Belichtung, eine sehr lange. Wenn nun auch unter natürlichen Verhältnissen nur in den seltensten Fällen alle die Lebensdauer solcher Hefezellen begünstigenden Einflüsse gleichzeitig vereinigt sein dürften, so führen doch diese Untersuchungsergebnisse die große Infektionsgefahr durch wilde Hefe für den Brauereibetrieb wieder deutlich vor Augen.

H. Will (München).

Grimm, M., Morphologisch-physiologische Untersuchungen über verschiedene *Oidium lactis*-Arten. (Bericht des landwirtschaftlich-bakteriologischen Laboratoriums am Ministerium der Agrikultur zu St. Petersburg. 1900. p. 18.)

Oidium lactis spielt, wie bekannt, eine nicht unbedeutende Rolle bei der Reifung der Weichkäse, die oft auf der ganzen Peripherie von den Wucherungen dieses Pilzes bedeckt sind und zum großen Teil ihr spezifisches Aroma seiner chemischen Zersetzungsarbeit verdanken. Von der morphologischen und physiologischen Seite ist diese Form, trotz des großen praktischen Interesses noch

1) Vergl. dieses Centralbl. II. Abt. Bd. III. 1897. p. 17; Bd. IV. 1898. p. 485; Bd. V. 1899. p. 527; Bd. VI. 1900. p. 226; Bd. VII. 1901. p. 438.

sehr wenig untersucht. Außer einer genauen Beschreibung des Pilzes durch Freudenreich und Lang sind in der Litteratur nur kurze Hinweise auf die eine oder andere physiologische Eigenschaft zu finden. Verf. machte sich eine vergleichende Untersuchung der verschiedenen Varietäten dieser Pilzform zur Aufgabe, die von ihm aus saurer Milch, aus verschiedenen Proben stark gesäuerten Rahmes, aus Paracasein, sowie von der Oberfläche des Limburger- und Brie-Käses isoliert worden waren. Die gefundenen Pilzformen konnten in 4 Gruppen untergebracht werden:

1) Das gewöhnliche *Oidium lactis*, eine Form die stets auf saurer Milch zu finden ist, und von Brefeld sowie Freudenreich und Lang genau beschrieben worden ist.

2) *Oidium lactis* α — vom Verf. aus Paracasein isoliert.

3) *Oidium lactis* β — gleichfalls vom Verf. isoliert und zwar sowohl aus Paracasein als auch von der Oberfläche des Brie-Käses. Die beiden letzteren Formen unterscheiden sich von der ersten sowohl durch ihre charakteristischen Kolonien auf Gelatineplatten als auch durch ihr viel bedeutenderes Peptonisationsvermögen.

4) *Oidium lactis cerebriforme* — eine sehr charakteristische Form, vom Verf. so genannt nach dem typischen Wachstum auf Kartoffeln.

Außer diesen 4 Formen wurden 3 von Weigmann seiner Zeit isolierte *Oidium*-Arten zum Vergleich herangezogen und zwar *Oidium lactis* d, *Oidium lactis* H₆ und *Oidium lactis* fadenziehendes. Was nun diese Formen anbetrifft, so dürfte *Oidium lactis* d mit dem vom Verf. isolierten *Oidium lactis* α identisch sein. Das fadenziehende *Oidium lactis* jedoch kann nach Meinung des Verf.'s überhaupt nicht als *Oidium* angesehen werden, sondern stellt eine *Torula* vor.

Der Unterschied zwischen den verschiedenen angeführten Formen besteht nicht nur im Charakter der Kolonien auf Gelatineplatten, sondern auch in verschiedenen morphologischen und physiologischen Eigenschaften: so in der Form und Größe der Conidien, in der Dicke des Myceliums, im Verhalten zu verschiedenen Nährsubstraten, in der Bildung von peptonisierenden Fermenten etc. Am charakteristischsten treten die Verschiedenheiten beim Wachstum auf Kartoffeln sowie sterilisiertem Casein hervor.

Autorreferat.

Papasotiriu, J., Untersuchungen über das Vorkommen des *Bacterium coli* in Teig, Mehl und Getreide, nebst einigen Bemerkungen über die Bedeutung des *Bacterium coli* als Indikator für Verunreinigung von Wasser mit Fäkalien. (Archiv für Hygiene. Bd. XLI. 1902. p. 204.)

Wolffin fand seiner Zeit bei der bakteriologischen Untersuchung der Sauerteiggärung als ausreichende Erklärung derselben ein dem *Bacterium coli* sehr nahestehendes Stäbchen, welches

vorläufig *Bacterium levans* genannt wurde. Ferner wurde durch diese Untersuchungen *B. coli* als ein in der Umgebung der Menschen weit verbreiteter Organismus nachgewiesen und die Bedeutung desselben z. B. als Indikator für Verunreinigung des Wassers durch Fäkalien sehr erschüttert. Die von Wolffin begonnenen Untersuchungen wurden von Fränkel fortgesetzt und letztere Untersuchungen wurden vom Verf. verifiziert, um die wichtige Frage des Vorkommens von *B. coli* in Teig, Mehl und Getreide ganz sicherzustellen. Zu diesem Behufe wurden 4 Schwarzbrot- und 4 Weißbrotteige untersucht und überall das *B. coli* isoliert. Dasselbe Resultat wurde auch bei der Untersuchung einer Probe Weizenmehl und verschiedener Cerealien und Leguminosen erhalten, wodurch der endgiltige Beweis geliefert ist, daß der provisorische Name *B. levans* zu verschwinden hat und daß *B. coli* als Organismus der Sauerteiggärung des Brotes zu bezeichnen ist. Weiter ist damit auch, ganz im Sinne Lehmanns, die geringe Bedeutung des *B. coli* als Indikator für Wasserverunreinigung bewiesen. Ueber diese Frage sind in letzter Zeit verschiedene Arbeiten erschienen, die zu ganz divergierenden Schlüssen geführt haben. Weissenfeld hat nachgewiesen, daß man in guten und schlechten Wässern *B. coli* züchten könne, während dagegen H. Chick nach wie vor *B. coli* als wichtigen Indikator einer Verunreinigung durch Effluvia des menschlichen Haushaltes betrachtet. Der scheinbare Widerspruch dieser Arbeiten erklärt sich aber ungezwungen aus der bei den Versuchen vorgenommenen Art der Kulturanlage.

In Zusammenfassung der sich ergänzenden Arbeiten von Weissenfeld, Chick und dem Verf. (einschließlich der Arbeiten Wolffin's und Fränkel's) ergibt sich folgendes:

a) Entgegen den Angaben von Chick ist in Teig und Mehl stets das Vorkommen von *B. coli* nachgewiesen, ebenso sehr oft in Getreide, sowie man eine Vorkultur benutzt. Für diesen Teil der Frage ist die Methode von Chick geradezu unzumutbar, denn bei Substanzen, die unter praktisch leicht erfüllbaren Bedingungen zu guten Nährstoffen für die Bakterien werden können, wie Mehl, interessiert bloß, ob der fragliche Organismus überhaupt anwesend ist, da er sich ja unter Umständen mächtig vermehrt.

b) Aus den Versuchen von Chick folgt nur, daß reine Wässer und die meisten reinen Nahrungsmittel keine größeren Mengen von *B. coli* enthalten und kam zu ähnlichen Resultaten wie Hammerl. Wenn dagegen Schardinger trotz Verwendung einer Vorkultur zu ähnlichen Resultaten wie Chick kam, so macht dies den Eindruck, als ob teils Verwendung von zu wenig Wasser, teils sehr enge Fassung des Begriffes *B. coli* an dem Ergebnis schuld sei.

c) In Wasser ist die Anwesenheit von spärlichen Keimen von *B. coli* ohne jede diagnostische Bedeutung. Durch Anwendung einer Vorkultur kann man mindestens die Anwesenheit von spärlichen Individuen von *B. coli* sehr oft nachweisen, wie Weissenfeld gezeigt hat.

d) Die Anwesenheit zahlreicher Individuen von *B. coli* in einem frisch geschöpften Wasser kann, wie man längst gewußt hat, und wie Chick weiter festgestellt hat, den Verdacht auf fäkale Verunreinigung eines Wassers erwecken. Es muß aber bei der weiten Verbreitung des *B. coli* der Schluß auf das wirkliche Bestehen dieser Verunreinigung noch durch andere Hilfsmittel gestützt sein, denn z. B. die Abwässer einer Bäckerei können eine Menge *B. coli* in ein Wasser bringen. *B. coli* vermehrt sich unter günstigen Bedingungen (höhere Temperatur, Kohlehydrate u. s. w.) sehr leicht im Wasser. Nach Gordon ist *B. coli* auch bei jeder Fäulnis pflanzlicher Produkte zu finden, und nach Lehmann und Conrad ist auch bei der Sauerkrautgärung ein Glied der Coligruppen in Massen vorhanden. Stift (Wien).

Laurent, E., Observations sur le développement des nodosités radicales chez les Légumineuses. (Compt. rend. T. CXXXIII. p. 1241—1243.)

Durch Versuche im Freien stellte Verf. den Einfluß verschiedener Salze auf die Bildung der Leguminosenknöllchen fest. Er kultivierte unter anderem eine Erbse (*Merveille d'Amérique*) 5 Jahre hintereinander in 5 verschiedenen Parzellen, von denen jedes Jahr No. 1 mit N-Salzen, No. 2 mit K-Salzen, No. 3 mit Ca-Superphosphat, No. 4 mit CaCO_3 und No. 5 mit NaCl gedüngt wurden. Es zeigte sich, daß in No. 1 (NaNO_3 oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) und No. 5 (NaCl) schon im zweiten Jahre keine Knöllchen mehr gebildet wurden, während bei No. 2 (K-Salze) und No. 3 (Superphosphat) die Knöllchen immer zahlreicher und dichter gedrängt auftraten und bei No. 4 (Kalk) zwar nicht viele aber immer sehr dicke Knöllchen erschienen. Die Versuchspflanzen waren aber bezüglich der Knöllchenbildung nur für den betreffenden Boden, nicht dauernd alteriert; denn in gewöhnliche Erde gebracht, produzierten alle wieder in normaler Weise zahlreiche Knöllchen. Die Ursache für das verschiedene Verhalten liegt vermutlich an den Leguminosenwurzeln, nicht an den Mikroben. Denn erstens bleiben die Bakterienkeime im Boden bei jeder Art Düngung erhalten — wie durch Infektion sterilisierten Bodens mit Erdproben aus No. 1 und No. 5 bewiesen wurde — und dann verhalten sich verschiedene Leguminosen denselben Salzen gegenüber verschieden. *Vicia villosa* und *sativa* beispielsweise bilden in No. 5 (NaCl), *Vicia Faba* in No. 1 (NaNO_3) und No. 5, wo bei *Pisum* die Knöllchen verschwanden, deren zahlreiche, während *Lupinus luteus* in No. 2 (K-Salze), wo *Pisum*-Knöllchen sich gut entwickelten, keine Nodositäten hervorbrachte.

Hannig (Straßburg).

Marchal, E., Influence des sels minéraux nutritifs sur la production des nodosités chez le Pois. (Compt. rend. T. CXXXIII. p. 1032—1033.)

Um festzustellen, ob bei Kulturen von Leguminosen in bak-

teroidenhaltigem Boden Nitrate ein spezifisches „antisymbiotisches“ Agens seien oder ob und bei welcher Konzentration auch andere Salze die Knöllchenbildung verhindern, stellte Verf. Wasserkulturen in Sachs'scher Nährlösung (ohne N-Salze) her, welchen er je eins der 14 geprüften Salze in verschiedenen Konzentrationsstufen zusetzte, impfte die steril gemachten Lösungen mit Bakteroidenaufschwemmung und kultivierte Serien von ca. 100 Erbsenkeimlingen. In diesen Wasserkulturen verhinderten nun nicht nur die Nitrate, sondern überhaupt alle untersuchten NH_3 -Salze die Knöllchenbildung, erstere schon bei Konzentration von $\frac{1}{100000}$, letztere bei solcher von $\frac{1}{2000}$, Ca-, Mg-Salze und Phosphorsäure dagegen wirkten mehr oder weniger begünstigend auf die Knöllchenbildung. Verf. schreibt die Hemmung der Beeinflussung der Mikroben durch die N-Salze zu, „dont le pouvoir osmotique incommode sans doute le Rhizobium et entrave son évolution“, welche Schlußfolgerung sich aber nicht mit den Befunden Laurent's (siehe vorhergehendes Referat) vereinigen läßt. Hannig (Straßburg).

Hiltner, Zur Kenntnis der Organismenwirkung im Boden und im Stallmist. (D. landw. Presse. 1901. No. 24, 25 und 27.)

Verf. ist der Ansicht, daß das Problem der Impfung landwirtschaftlicher Kulturböden mit Bakterienreinkulturen von spezifischer Wirksamkeit ein aussichtsvolles und eingehender Studien wohl würdiges ist. Er selbst hat bei Topf- und Feldversuchen durch Impfung mit verschiedenen, aus Boden und Stallmist gezüchteten Reinkulturen zum Teil recht erhebliche Mehrerträge gegenüber ungeimpften Vegetationsgefäßen und Parzellen erzielt. Interessant ist die hierbei aufgetretene Thatsache, daß in einigen Fällen denitrifizierende Bakterien, also solche, die durch Salpeterzersetzung zu Stickstoffverlusten führen können, erhöhend auf die Ernterträge einwirkten. Alle von H. geprüften Reinkulturen waren dem bekannten bakteriologischen Impfdünger Alinit an Wirksamkeit überlegen. Verf. teilt einige Beobachtungen über die Einwirkung meteorologischer und klimatischer Einflüsse auf die Bakterienflora des Bodens mit und verspricht sich bei noch vorzunehmenden Bodenimpfungen viel von einer Störung des „Gleichgewichtszustandes“, in welchem sich die den Boden bewohnenden Mikroorganismen für gewöhnlich befinden. Die Ackergare, also der Zustand des Bodens, in welchem die Bakterien in lebhaftester Vermehrung und Entfaltung ihrer Lebensthätigkeit begriffen sind, dürfte etwa das dem Gleichgewichtszustande entgegengesetzte Stadium sein. Auch die bekannte günstige Einwirkung des Schwefelkohlenstoffs auf die Ertragsfähigkeit des Bodens beruht auf einer Störung dieses Ruhezustandes der Bakterien, gewissermaßen auf der beschleunigten Herbeiführung einer Gare durch dieses chemische Mittel.

Bezüglich der Impfung von Leguminosen mit Reinkulturen weist Verf. auf die große Bedeutung der Virulenzverhältnisse der

zu verwendenden Knöllchenbakterien hin. Es verhielten sich z. B. Reinkulturen von Erbsenbakterien, welchen Gelegenheit geboten war, mehrmals nacheinander in den Wurzeln jugendlicher Erbsenpflanzen zu leben, von viel besserer Impfwirkung als andere Bakterien von geringerem Virulenzgrade. Diese gute Wirkung der virulenten Bakterien trat auch in nicht sterilisierter Erde, welche Erbsenbakterien der gewöhnlichen avirulenten Art schon reichlich enthielt, noch deutlich auf.

Die Leguminosenmüdigkeit mancher Böden wird nach Untersuchungen des Verf.'s durch eine Gruppe von Bakterien bewirkt, welche Pektin- und Cellulosegärungen verursachen.

Schließlich kommt Verf. auf die Bedeutung der Bakterien im Stallmist zu sprechen und weist unter anderem auf die interessante Thätigkeit eines Schimmelpilzes hin, welcher in ausgesprochener Weise Ammoniumsalze, besonders Ammoniumkarbonat als Stickstoffnahrung bevorzugt, und daher gewisse Mengen dieses flüchtigen und wertvollen, bei der Zersetzung des Harnstoffes entstehenden Körpers festzulegen vermag. Vogel (Posen).

Magnus, P., Eine zweite neue *Phleospora* von der deutschen Meeresküste. (Hedwigia. 1900. p. 111. Mit Taf. VII.)

Von Jaap wurde auf *Eryngium maritimum* bei Heiligenhafen ein Pilz entdeckt, den Magnus als neu erkannte und *Phleospora eryngii* nannte. Der Pilz besitzt intercellulares Mycel, das sich unter den Spaltöffnungen dichter verflechtet. Hier entsteht die Sterigmenschicht, welche die Spalte einfach durchwächst oder bisweilen die Cuticula der Schließzellen und der angrenzenden Epidermiszellen emporhebt. Die Sporen sind fädig und 3—5-zellig.

Ueber ähnliche auf Umbelliferen vorkommende Pilze verbreitet sich Verf. kurz und verspricht über ihre Systematik weitere Mitteilungen. Lindau (Berlin).

Neger, F. W., Beiträge zur Biologie der Erysipheen. [Zweite Mitteilung.] (Flora. Bd. XC. 1902. Heft 2.)

Die Keimungserscheinungen der Conidien zeigen bei den verschiedenen Erysipheenarten eine Reihe wichtiger Unterschiede. Zumeist treten die Keimschläuche an den Schmalseiten der Sporen oder in ihrer unmittelbaren Nähe hervor. Wenige Arten (*Phyllactinia corylea*, *Erysiphe graminis* u. a.) machen hiervon eine Ausnahme, da bei ihnen die Keimschläuche sehr häufig auch an den Langseiten entstehen. Die Länge der Keimschläuche, die Art der Verzweigung und Haftscheibenbildung läßt ebenfalls konstante Unterschiede erkennen. Licht bewirkt eine Beschleunigung der Keimschlauchbildung, sowie in vielen Fällen ein Wachstum des Keimschlauches gegen die Lichtquelle hin. Nach Verf. lassen sich die bei der Keimschlauchbildung beobachteten Vorgänge besonders für die Gattung *Erysiphe* zur Umgren-

zung der Arten verwerten. So z. B. läßt sich als sicher annehmen, „daß die auf Boragineen schmarotzende Erysiphe verschieden ist von dem auf Kompositen lebenden Mehltaupilz — beide bisher als *E. Cichoriacearum* bezeichnet. Gleiches gilt für Erysiphe auf Papilionaceen und auf Umbelliferen — beide bisher als *E. Polygoni* bezeichnet u. a.“ — *Uncinula Aceris* bildet zweierlei Conidien: normale, 30–35 μ große, die leicht abfallen und gut keimen, und rückgebildete, 8–12 μ große, die sich schwer voneinander ablösen und leicht zum keimen sich bringen lassen („Hungerconidien“). Möglicherweise sind sie als Analogon zu den bekannten, größtenteils keimunfähigen, in den Spermogonien der Uredineen und anderer Pilzgruppen gebildeten Spermarien zu betrachten.“

Die „Infektionsversuche mittels der Conidien“ bestätigten die aus der Betrachtung der Keimschläuche gewonnenen Resultate hinsichtlich der Selbständigkeit einzelner Formen (s. o. über *E. Cichoriacearum*). Ähnlich wie bei manchen Uredineen scheint auch bei vielen Erysipheen eine weitgehende Spezialisierung des Parasitismus sich geltend zu machen. Infektionsversuche mit Conidien ergaben, daß die Uebertragung eines Mehltaupilzes von einer Wirtspflanze auf die andere, die nach den bisherigen Anschauungen dem gleichen Pilz ebenfalls als Nährboden dienen kann, in vielen Fällen nicht gelingt. Der Umstand, „daß auf einjährigen Pflanzen, z. B. *Senecio vulgaris* . . . eine Erysiphe sich in jedem Jahre reichlich entwickelt, ohne indessen je zur Perithezienbildung zu gelangen, legt die Vermutung nahe, daß mittels der Ascosporen die Uebertragung eines Mehltaupilzes von einer Art auf eine andere (Wirtspflanze) wohl möglich ist. Demnach waren die Ascosporen dadurch ausgezeichnet, daß sie das Bestreben zeigen, den Kreis der Wirtspflanzen eines Pilzes weit zu erhalten, während die Conidien sich sehr schnell einem bestimmten Substrat anpassen.“ Ein exakter Beweis hierfür wird sich nur schwer erbringen lassen. Verf. weist darauf hin, daß bei den Uredineen manche Beobachtungen auf eine analoge Bedeutung der Aecidien hinweisen.

Der Ernährungsmechanismus der Mehltaupilze ist verschieden je nach der Fähigkeit der Wirtspflanze, auf den vom Pilz ausgehenden Reiz zu reagieren. Die Haustorien beschränken sich auf die Epidermiszellen, wenn diese hypertrophieren (*Sphaerotheca Humuli*). Anderenfalls dringen sie häufig in das Mesophyll ein (z. B. *Uncinula Salicis*).

Küster (Halle a. S.).

Eriksson, Jakob, Fortgesetzte Studien über die Hexenbesenbildung bei der gewöhnlichen Berberitze. (F. Cohn's Beiträge zur Biologie der Pflanzen. Bd. VIII. Heft 2. p. 3–127. Tab. VI–VIII.)

Frühere Untersuchungen hatten die Zusammengehörigkeit von *Aecidium graveolens* (Shuttl.) Magn., welches an *Berberis vulgaris* Hexenbesenbildungen hervorruft, mit *Puccinia Arrhenatheri* (Kleb.) Eriks. auf *Avena elatior* erwiesen. Der

Zweck der vorliegenden war nun, nachzuweisen, daß auch eine Infektion mit den Teleutosporen des Graspilzes auf der Berberitze Hexenbesen hervorrufen kann. Verf. begann seine Versuche im Jahre 1897 und kommt bis zum Ende des Jahres 1900 auf Grund seiner Erfahrungen zu folgenden Schlüssen:

Puccinia Arrhenatheri kann die Berberitze thatsächlich anstecken und auf ihr den Hexenbesenrost erzeugen, jedoch beträgt die Inkubationsdauer zumeist ein Jahr. Die natürliche Eintrittsstelle des Pilzes ist die Centralknospe der zarten Blattrosetten, doch sind die Sporen oder Sporidien auch auf entwickelten Blättern der Rosetten nicht wirkungslos.

Die bedeutsamste Schlußfolgerung der sorgfältigen Arbeit von allgemeinem Werte ist jene von Eriksson vertretene Ansicht, „daß das Entstehen der Hexenbesen nicht so aufzufassen ist, als ob durch die Einwanderung des Pilzes die befallenen Gewebepartien des Berberitzenstrauches in ihrer Entwicklung unterdrückt würden, sondern vielmehr so, daß diese dadurch zu einer enorm, schnellen und kräftigen Höhe des Wachstums und der Verzweigung gereizt werden. Lange bleibt jedoch die anfängliche Ueberlegenheit dieser Teile nicht bestehen. Es tritt recht bald ein Zustand von Schwäche ein, welcher das Organ gegen die Winterkälte weniger widerstandsfähig macht und einzelne Teile desselben zu einem vorzeitigen Tode führt.“

Die drei Tafeln geben photographische Reproduktionen von Berberitzenzweigen mit durch künstliche Infektion hervorgerufenen Hexenbesen.

Francé (Ung.-Altenburg).

Feinberg. Ueber den Erreger der krankhaften Auswüchse des Kohls (*Plasmodiophora Brassicae* Woronin). (Deutsche med. Wochenschr. 1902. No. 3.)

Die im Jahre 1874 zuerst von Woronin in krankhaften Auswüchsen des Kohls nachgewiesenen Myxomyceten haben in neuerer Zeit öfters die allgemeine Aufmerksamkeit auf sich gezogen, weil man zwischen ihnen und den gesuchten Erregern der menschlichen Geschwülste gewisse Beziehungen vermutete. Feinberg hat sich daher dem Studium der genannten Mikroorganismen gewidmet und diese in Kohlhernien verschiedener Kohlarten untersucht. Er fand die Sporen in Massen in den frischen Schnitten; ließ er Stücke von den letzteren im Wasser liegen, so konnten die Sporen nach 1—2 Tagen frei oder zu kleinen Schleimflöckchen vereinigt im Wasser gefunden werden. In geheilten Schnitten von Kohlhernien fand er: a) Zellen, die mit Sporen vollgepropft waren, b) Zellen mit ausgewachsenen Amöben. c) Zellen mit Uebergangsformen des Plasmodium zur Spore. Die Sporen erwiesen sich als runde Körperchen, etwas größer als die normalen Kernkörperchen der Wirtszellen, und waren von einer scharf erkennbaren doppelt konturierten Membran umgeben. Die ausgewachsenen Amöben hatten ein feinmaschiges Plasma und einen oder mehrere charakteristische Kerne. Die Kerne bestanden aus einem Kernkörperchen

und einer nach außen scharfgerandeten hellen Zone; das Bild verglich v. Leyden mit einem Vogelauge. Feinberg hat diese Kerne auch bei den Malariaplasmodien, wenn auch erst in einem einzigen Falle, gesehen und erklärt sie für eine Eigentümlichkeit der einzelligen tierischen Organismen. Bei menschlichen Geschwülsten hat er die Parasiten nicht gefunden, namentlich auch nicht die Sporen, die in den Kohlgeschwülsten durch ihre Massenhaftigkeit dem Untersucher niemals entgehen können.

Kübler (Berlin).

Noack, F., Eine Treibhauskrankheit der Weinrebe. (Gartenflora. Jahrg. L. 1901. p. 619–622.)

Es handelt sich hier um eine zweifellos nicht parasitäre Krankheit, die Verf. in einem Treibhause zu Darmstadt am blauen Trollinger beobachtet hat, wo sie empfindlichen Schaden angerichtet hatte. An den noch unreifen Beeren treten helle Flecke auf, die allmählich einsinken und sich bräunen. An den kranken Stellen stirbt das Fruchtfleisch ab. Außerdem finden sich Krankheitserscheinungen an den Blättern. Auf ihrer Ober- und Unterseite, hauptsächlich auf letzterer, zeigen sich zahlreiche, kleine, anfangs grünliche, später dunkelbraune Knötchen. Es sind dies abnorme Gewebewucherungen des Blattparenchyms. Diese Wärschen stimmen mikroskopisch überein mit den Blattintumescenzen, die von anderen Pflanzen bereits beschrieben worden sind. (Sorrer Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 1899. p. 457.) Nach Ansicht des Verf.'s werden die Krankheitserscheinungen lediglich durch die ungünstigen Vegetationsbedingungen im Treibhaus: hohe Temperatur bei ungenügender Transpiration hervorgerufen. Um die Krankheit zu bekämpfen, bezüglich zu verhüten, wird empfohlen, bei der Traubentreiberei für gute Lüftung zu sorgen und das Bespritzen möglichst einzuschränken. Laubert (Bonn-Poppelsdorf).

Baudisch, F., Ueber *Hylastes cunicularius* Er. (Centralbl. f. d. ges. Forstwesen. Jahrg. XXVII. 1901. p. 509–511. 1 Abb.)

In einer 4-jährigen Fichtenkultur war eine größere Anzahl von Pflanzen durch den schwarzen Fichtenbastkäfer (*Hylastes cunicularius*) zum Absterben gebracht worden, wobei es durch Ausheben und Verbrennen den befallenen Pflanzen noch nicht gelang, die Vermehrung des Schädlings zu verhindern. Im darauffolgenden Juli nämlich und weiterhin zeigten sich unter den Fangrinden, welche zum Zwecke der Vertilgung des *Hylobius abietis* gelegt worden waren, beträchtliche Mengen des *Hylastes*, so daß namentlich an sonnigen Stellen auf Rindenstücken von ca. 600 ccm Größe 50 und mehr Käfer gefunden wurden, die sich bis an die Hinterleibsspitze in die Borke eingebohrt hatten. Die Ränder der Fangrinden wurden dabei bevorzugt. Daraus ergibt sich die Nutzanwendung, daß ein bloßes Absuchen der Fangrinden nach dieser Käferart nicht genügt, sondern ein durchgreifender Erfolg nur von dem Sammeln der Stücke in Tücher und Ver-

brennen zu erwarten ist. Auch müssen die Fangrinden, um von *Hylastes* angenommen zu werden, fest am Boden aufliegen, daher mit Steinen oder Rasenstücken beschwert werden. Das Auslegen muß bis zum Spätherbst fortgesetzt werden, weil von den beiden Generationen, die *Hylastes* liefert, die zweite sich vielfach noch bis Ende Oktober zur Imago entwickelt. Als Vorbeugungsmittel empfiehlt Verf. hauptsächlich eine gründliche Stock- und Wurzelrodung, wo sie der Lage und der Kosten wegen anwendbar ist, sonst wenigstens eine Schlagruhe bis zu 2 Jahren und Anlage von Fanggräben; zu warnen ist vor der Tiefpflanzung von Fichten.

Jacobi (Berlin).

Neue Litteratur,

zusammengestellt von

San.-Rat Dr. ARTHUR WÜRZBURG,

Bibliothekar im Kaiserl. Gesundheitsamte in Berlin.

Untersuchungsmethoden, Instrumente etc.

- Hoffmeister, C.**, Zum Nachweis des Zellkerns bei *Saccharomyces*. (Ztschr. f. d. ges. Brauwesen 1902. No. 15. p. 225—230.)
Prall, F., Beitrag zur Kenntnis der Nährböden für die Bestimmung der Keimzahl im Wasser. (Arb. a. d. kaiserl. Gesundh.-A. Bd. XVIII. 1902. Heft 3. p. 436—452.)

Systematik, Morphologie und Biologie.

- Brown, H. T.** and **Glendinning, T. A.**, The velocity of hydrolysis of starch by diastase, with some remarks on enzyme action. (Journ. of the chemical soc. 1902. April. p. 388—400.)
Cameron, P., Description of a new species of gall-making cynipidae (*Callirhytis semicarpifoliae* n. sp.) from the N. W. Himalayas. (Entomologist. 1902. Febr. p. 38—39.)
Dietel, P., Ueber die biologische Bedeutung der Paraphysen in den Uredolagern von Rostpilzen. (Beibl. z. Hedwigia. 1902. No. 2. p. 58—61.)
Grassberger, R., u. **Schattenfroh, A.**, Ueber Buttersäuregärung (II. Abhandlung). (Arch. f. Hygiene. Bd. XLII. 1902. Heft 3. p. 219—264.)
Henri, V., Action de quelques sels neutres sur l'inversion du saccharose par la sucrase. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1902. No. 11. p. 353—354.)
Hesse, A., Nochmals die Schwefelsäureche. (Ztschr. f. Spiritusindustrie. 1902. No. 15. p. 159—161.)
Lesage et Dongier, Étude de la fermentation lactique par l'observation de la resistance électrique. (Compt. rend. de l'acad. d. scienc. T. CXXXIV. 1902. No. 10. p. 612—614.)
Maassen, A., Die biologische Methode Gosio's zum Nachweis des Arsens und die Bildung organischer Arsen-, Selen- und Tellurverbindungen durch Schimmelpilze und Bakterien. (Arb. a. d. kaiserl. Gesundh.-A. Bd. XVIII. 1902. Heft 3. p. 475—489.)
Prunet, A., Développement du black rot. (Compt. rend. de l'acad. d. scienc. T. CXXXIV. 1902. No. 18. p. 1072—1075.)

Thomas, P., Sur la séparation du galactose et du glucose par le *Saccharomyces* Ludwigii. (Compt. rend. de l'acad. d. scienc. T. CXXXIV. 1902. No. 10. p. 610—612.)

Zykoff, W., Wo sollen wir den Zwischenwirt des *Cystoopsis acipenseris*. N. Wagn. suchen? (Biolog. Centralbl. 1902. No. 8. p. 229—233.)

Beziehungen der Bakterien und Parasiten zur unbelebten Natur.

Nahrungs- und Genußmittel, Gebrauchsgegenstände.

Milch, Molkerei.

Doane, C. F., and Price, T. M., The comparative digestibility of raw, pasteurized and cooked milk. (Maryland agricult. experim. stat. 1901. Bullet. No. 77. 38 p.)

Wein, Weinbereitung.

Muntz, A., Recherches sur l'influence de la pourriture grise du raisin sur le rendement et la qualité des vins. (Annal. agronom. 1902. No. 4. p. 177—208.)

Andere Nahrungs- und Genußmittel.

Schmidt, H., Ueber die Einwirkung gasförmiger Blausäure auf frische Früchte. (Arch. a. d. kaiserl. Gesundh.-A. Bd. XVIII. 1902. Heft 3. p. 490—517.)

Beziehungen der Bakterien und Parasiten zu Pflanzen.

Krankheitserregende Bakterien und Parasiten. Pflanzenschutz.

Gateshead, J. B., Bacteriosis in orchids. (Gard. chronicle. London 1902. Vol. XXXI. 1902. p. 12.)

Gerber, C., Sur une hemiptéroécidie et une coléoptéroécidie des environs de Marseille. (Compt. rend. de la soc. de biol. 1902. No. 15. p. 476—477.)

Hennings, P., Ueber das epidemische Auftreten von *Cronartium ribicola* Dietr. im Dahlemer botanischen Garten. (Notizbl. d. kgl. botan. Gart. u. Mus. in Berlin. Bd. III. 1902. No. 28. p. 172—175.)

Hertzog, *Peronospora* und *Oidium*. (Landwirtschaftl. Ztschr. f. Elsaß-Lothringen. 1902. No. 19. p. 314—316.)

Lochhead, W., Injurious insects of the season of 1901. (32. ann. rep. of the entomol. soc. of Ontario 1901. Toronto 1902. p. 43—50.)

Magnus, P., Ueber den Stachelbeer-Mehltau. (Gartenflora. 1902. Heft 9. p. 245—247.)

Noël, P., La cécidomyie du hêtre (*Hormomyia fagi*). (Naturaliste. 1902. No. 365. p. 118.)

Rother, Was ich gegen den Gummifluß that. (Erfurter Führer im Gartenbau. 1902. p. 409—410.)

Steffen, J., Eine kleine Erinnerung an die Dürffleckigkeit der Johannisbeeren. (Erfurter Führer im Gartenbau. 1902. p. 364.)

Woods, Ch. D., Experiments with fungicides on potatoes in 1900. (17. ann. rep. of the Maine agricult. experim. stat. Orono 1901. 1902. p. 49—57.)

Entwicklungshemmung und Vernichtung der Bakterien.

Capdevielle, A., Contribution à l'étude de l'action des rayons chimiques de la lumière sur la peau et sur les microorganismes. Thèse. Lyon. 1901.

Disinfection. Experiments on Disinfection. Report by the Medical Officer presenting Joint Report by Drs. Klein, Houston, and Gordon on the result of their experiments in connection with the subject of disinfection. London 1902. 4 d.

Ullmann, J., Ueber die Einwirkung elektrischen Bogenlichts auf Mikroorganismen in Gegenwart von fluoreszierenden Stoffen. Inaug.-Dissert. München 1901. 16 p. 8°.

Inhalt.

Originalmitteilungen.

- Beijerinck, M. W. und van Delden, A.**, Ueber die Assimilation des freien Stickstoffs durch Bakterien. (Orig.), p. 3.
- Bokorny, Th.**, Ueber die Abhängigkeit der Assimilationsthätigkeit der Hefe von verschiedenen Einflüssen. (Orig.), p. 55.
- Omelianski, W.**, Kleinere Mitteilungen über Nitrifikationsmikroben. (Orig.), p. 63.
- Winogradsky, S.**, *Clostridium Pastorianum*, seine Morphologie und seine Eigenschaften als Buttersäureferment. (Orig.), p. 43.

Referate.

- Barker**, Sexual spore formation among the Saccharomycetes, p. 68.
- Baudisch, F.**, Ueber *Hylastes cunicularius* Er., p. 77.
- Brandt, K.**, Ueber die Stoffwechsel im Meere, p. 65.
- Eriksson, Jakob**, Fortgesetzte Studien über die Hexenbesenbildung bei der gewöhnlichen Berberitze, p. 75.
- Feinberg**, Ueber den Erreger der krankhaften Auswüchse des Kohls (*Plasmodiophora Brassicae* Woronin), p. 76.
- Grimm, M.**, Morphologisch-physiologische Untersuchungen über verschiedene *Oidium lactis*-Arten, p. 69.

Hiltner, Zur Kenntnis der Organismenwirkung im Boden und im Stallmist, p. 73.

Jwanoff, Ueber die Zusammensetzung der Eiweißstoffe und Zellmembranen bei Bakterien und Pilzen, p. 65.

Kulescha, G., Untersuchungen über die Bakterienflora der Heringslake, p. 67.

Laurent, E., Observations sur le développement des nodosités radicales chez les Légumineuses, p. 72.

Magnus, P., Eine zweite neue *Phleospora* von der deutschen Meeresküste, p. 74.

Marchal, E., Influence des sels minéraux nutritifs sur la production des nodosités chez le Pois, p. 72.

Neger, F. W., Beiträge zur Biologie der Erysiphe, p. 74.

Noack, F., Eine Treibhauskrankheit der Weinrebe, p. 77.

Papasotiriou, J., Untersuchungen über das Vorkommen des *Bacterium coli* in Teig, Mehl und Getreide, nebst einigen Bemerkungen über die Bedeutung des *Bacterium coli* als Indikator für Verunreinigung von Wasser mit Fäkalien, p. 70.

Will, H., Einige Beobachtungen über die Lebensdauer getrockneter Hefe, p. 69.

Neue Litteratur, p. 78.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

In meinem Verlage begann vor kurzem zu erscheinen:

Archiv für Protistenkunde

herausgegeben von

Dr. Fritz Schaudinn,

Privatdozent an der Univ. Berlin, z. Zeit Rovigno (Istrien), Zool. Station.

Das Archiv für Protistenkunde erscheint im Format des Anatomischen Anzeigers in zwanglosen Heften, die Hefte werden zu Bänden von je 30 Druckbogen Text und 15 Tafeln oder, soweit Tafeln nicht in dieser Zahl erforderlich sind, unter entsprechender Vermehrung der Druckbogenzahl vereinigt. Ein besonderer Wert wird auf eine möglichst rasche Veröffentlichung der eingegangenen Manuskripte gelegt werden. Das soll dadurch erreicht werden, dass, sobald der vorliegende Stoff es gestattet, Hefte zur Ausgabe gebracht werden, so dass lieber mehr Hefte in geringerer Stärke als wenige Hefte von grösserem Umfang erscheinen. Es werden Arbeiten in deutscher, französischer und englischer Sprache veröffentlicht. Der Abonnementspreis des Archiv für Protistenkunde beträgt M. 24.— für den Band.

Der Inhalt des ersten und zweiten Heftes ist folgender:

- Hertwig, Richard, Die Protozoen und die Zelltheorie.
Bütschli, O., Bemerkungen über Cyanophyceen und Bacteriaceen. (Mit 1 Tafel.)
Brandt, K., Beiträge zur Kenntnis der Colliden. (Mit 2 Tafeln.)
Lohmann in Kiel, Die Coccolithophoridae, eine Monographie der Coccolithen bildenden Flagellaten. (Mit 3 Tafeln.)
Prowazek, S., Notiz über die Trichomonas hominis (Davaine). (Mit 4 Textfiguren.)
Doflein, Franz, Das System der Protozoen. (Mit 3 Textfiguren.)
Rumbler, Ludwig, Die Doppelschalen von Orbitolites und anderer Foraminiferen. (Mit 2 Tafeln und 17 Textfiguren.)
Prowazek, S., Die Entwicklung der Gregarinen. (Mit 1 Tafel.)
Schaudinn, Fritz, Beiträge zur Kenntnis der Bakterien und verwandter Organismen. I. Bacillus bütschlii n. sp. (Mit 1 Tafel.)
Senn, G., Der gegenwärtige Stand unserer Kenntnisse von den flagellaten Blutparasiten.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Der Kampf um die Weinverbesserung im deutschen Reiche.

Ein Beitrag zur Wirtschaftsgeschichte der Gegenwart
nebst einer

Produktionsstatistik des deutschen Weinbaues.

Von

Dr. Fritz Wichmann.

Preis: 4 Mark 50 Pf.

Das Eisen als das thätige Prinzip der Enzyme und der lebendigen Substanz.

Von **N. Sacharoff.**

Ins Deutsche übersetzt von Dr. **M. Rechtsamer** in Odessa.

Mit 15 Abbildungen. Preis: 2 Mark 50 Pf.

Vergleichende Morphologie der Pilze.

Von **Dr. F. von Tavel.**

Dozent der Botanik, Zürich.

Mit 90 Holzschnitten. Preis: 6 Mark.



* Verlag von Gustav Fischer in Jena *



Naturwissenschaftliche Wochenschrift . . .

Berausgegeben von Prof. Dr. **S. Potonié** und Oberlehrer Dr. **F. Koerber**
in Grosslichterfelde-W. b. Berlin

== Preis vierteljährlich 1 Mark 50 Pfg. ==



Trotz des reichen Inhalts der Zeitschrift ist der Preis
so billig angesetzt worden, um jedem zu ermöglichen, seine
naturwissenschaftliche Zeitschrift sich selbst zu halten.
Probenummern durch jede Buchhandlung oder von der
Verlagsbuchhandlung unentgeltlich zu beziehen.

